

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP  
EKSPRESI GEN *TYROSINASE* DAN *TRP1*  
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi  
yang Terpapar UVB)**

**TESIS**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Disusun Oleh:

Nenny Lynda Caroline Hutabarat

MBK 2118010263

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

**2023**

TESIS  
PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP  
EKSPRESI GEN *TYROSINASE* DAN *TRPI*

(Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi yang  
Terpapar UVB)

Disusun oleh :

Nenny Lynda Caroline Hutabarat

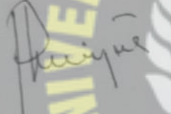
MBK 218010263

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 8 Februari 2023 dan  
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

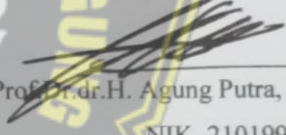
Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,

Pembimbing II,

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

NIK. 8951110021

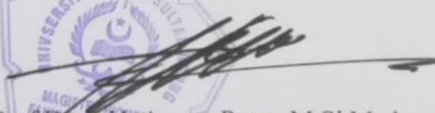
  
Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210199050

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Unissula

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

## PERNYATAAN

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

Semarang, Desember 2023

(Nenny Lynda Caroline Hutabarat)



## ABSTRAK

**Latar belakang:** Irradiasi UVB dapat menginduksi terbentuknya *Reactive Oksigen Species* (ROS) yang menyebabkan aktivasi sintesis melanin melalui aktivasi tyrosinase dan tyrosinase related protein-1 (TRP1). Metabolit sekunder 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 tyrosinase dan TRP1 pada jaringan kulit tikus yang terpapar UVB.

**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/cm<sup>2</sup>/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 tyrosinase dan TRP1 dianalisis menggunakan qRT-PCR.

**Hasil:** Analisis qRT-PCR menunjukkan bahwa terdapat penurunan ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 yang signifikan antara kelompok K3 (tyrosinase 3,19±2,12 dan TRP1 4,96±3,42) dan K4 (tyrosinase 0,65±0,44 dan TRP1 2,22±1,18) dibandingkan dengan kelompok K2 (tyrosinase 17,92±3,77 dan TRP1 35,91±4,52).

**Kesimpulan:** Pemberian gel ekstrak kulit petai dapat menurunkan ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

**Kata kunci :** Paparan UVB, ekstrak kulit petai, tyrosinase, TRP1

## ABSTRACT

**Background:** UVB irradiation can induce the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) which causes activation of melanin synthesis through activation of tyrosinase and tyrosinase related protein-1 (TRP1). Secondary metabolites 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 the expression of the tyrosinase and TRP1 genes in mouse skin tissue exposed to 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 390mJ/cm<sup>2</sup>/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. Tyrosinase and TRP1 gene expression was analyzed using qRT-PCR.

**Results:** qRT-PCR analysis showed that there was a significant decrease in tyrosinase and TRP1 gene expression between groups K3 (tyrosinase 3,19±2,12 and TRP1 4,96±3,42) and K4 (tyrosinase 0,65±0,44 and TRP1 2,22±1,18) compared to group K2 (tyrosinase 17,92±3,77 and TRP1 35,91±4,52)..

**Conclusion:** Administration of petai peel extract gel can reduce the expression of tyrosinase and TRP1 genes in hyperpigmentation mice exposed to UVB light.

**Key words:** UVB exposure, petai peel extract, tyrosinase, TRP1

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur ke hadirat Tuhan YME atas segala rahmat dan karunia-NYA pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Penyusunan tesis yang berjudul : **PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT PETAI TERHADAP EKSPRESI GEN *TYROSINASE* DAN *TRPI* (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)** Tesis ditulis dalam rangka memenuhi sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

Selanjutnya ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

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



6. Suamiku Tersayang Binsar S Purba SH. M. Tr. SOU dan Anak-anakku tersayang Chalysa Julliete Irenabelle Purba, Christopher B Marulitua Purba dan Clara Aurico M. Purba yang telah memberikan dukungan moril, Doa dan kekuatan yang luar biasa selama saya menjalani pendidikan dan penyusunan tesis ini .
7. 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.

Semarang, Desember 2023

(Nenny Lynda Caroline Hutabarat)



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK .....	iv
RIWAYAT HIDUP.....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. <i>Tyrosinase</i> .....	8
2.2. <i>Tyrosinase</i> -related protein-1 ( <i>TRP1</i> ).....	11
2.3. Hiperpigmentasi .....	13
2.4. Ekstrak Kulit Petai .....	16
2.4.1. Definisi Ekstrak Kulit Petai.....	16
2.4.2. Kandungan Senyawa Aktif Kulit Petai.....	17



2.5. Efek Kulit Petai Terhadap Ekspresi Gen <i>Tyrosinase</i> dan <i>TRP1</i> .....	20
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS .....	22
3.1. Kerangka Teori.....	22
3.2. Kerangka Konsep .....	25
3.3. Hipotesis.....	25
BAB IV METODE PENELITIAN .....	26
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	26
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	27
4.2.1. Variabel Penelitian .....	27
4.2.2. Defenisi Operasional .....	27
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian .....	29
4.3.1. Subjek Penelitian.....	29
4.3.2. Sampel Penelitian .....	29
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian.....	30
4.3.4. Besar Sampel.....	30
4.4. Alat dan Bahan .....	31
4.4.1. Alat .....	31
4.4.2. Bahan.....	31
4.5. Cara Penelitian .....	31
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i> .....	31
4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Kulit Petai .....	32
4.5.9. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB .....	36
4.5.10. Validasi Peningkatan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin.....	37
4.5.11. Pengambilan Sampel Jaringan.....	37
4.5.12. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen <i>Tyrosinase</i> dan <i>TRP1</i> menggunakan RT-PCR.....	38
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian .....	40
4.7. Analisa Data .....	40
4.8. Alur Penelitian.....	42

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1.1 Ekstraksi Kulit Petai.....	43
5.1.2 Validasi Model Hiperpigmentasi .....	44
5.1.3 Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen Tyrosinase .....	45
5.1.4 Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen TRP1 .....	48
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	53
DAFTAR PUSTAKA .....	67



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Peran Enzim <i>Tyrosinase</i> dalam Proses Pembentukan Melanin .	11
Gambar 2.2. Mekanisme UVB Menginduksi Hiperpigmentasi melalui TRP.	13
Gambar 2.3. Mekanisme Pembentukan Melanin .....	15
Gambar 2.4. Kulit Petai.....	19
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	22
Gambar 3.2. Kerangka Konsep .....	23
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian .....	24
Gambar 4.2. Validasi Jumlah Melanin dengan Fontana-Masson .....	35
Gambar 4.3. Alur penelitian.....	42



## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 4.1. Komponen PCR Mix GPx.....	37



## DAFTAR SINGKATAN

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

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





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi adalah pembentukan pigmen berwarna hitam pada kulit akibat dari peningkatan jumlah melanin yang disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet B (UVB).<sup>1</sup> Radiasi UVB dapat merangsang produksi melanin dalam sel-sel kulit, terutama melanosit, yang bertanggung jawab menimbulkan warna hitam pada kulit.<sup>2</sup> *Tyrosinase* dan *tryrosinase-related protein 1 (TRP-1)* merupakan enzim yang terlibat dalam biosintesis melanin.<sup>3</sup> *Tyrosinase* berperan dalam tahap awal sintesis melanin, sementara *TRP1* terlibat dalam tahap pematangan dan penyebaran melanin.<sup>4</sup> Ekspresi yang berlebihan dari kedua enzim ini dapat menyebabkan produksi melanin yang berlebihan, sehingga berkontribusi pada terjadinya hiperpigmentasi.<sup>5</sup> Beberapa terapi standar hiperpigmentasi seperti retinol, hidrokuinon, dan asam tranexamat menyebabkan timbulnya kanker pada penggunaan jangka panjang.<sup>6</sup> Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan untuk mencegah hiperpigmentasi akibat paparan UVB, salah satunya menggunakan senyawa antioksidan alami.

Penggunaan beberapa agen kimiawi seperti arbutin, asam azelaic, asam kojic, dan hidrokuinon dalam pencegahan hiperpigmentasi dilaporkan memiliki efek samping yang merugikan, termasuk genotoksisitas, iritasi kulit, dermatitis kontak, dan peningkatan risiko kanker kulit.<sup>7</sup> Pada tahun 2015,

sekitar 4,2% dari 142 subjek yang terpapar tiga kali minimal erythema dose (MED) UVB 390mj/cm<sup>2</sup> mengalami hiperpigmentasi.<sup>8</sup> Di Indonesia, kasus hiperpigmentasi mencapai sekitar 0,25-4% dari seluruh kasus penyakit kulit.<sup>9,10</sup> Pengobatan standar hiperpigmentasi kulit berfokus pada perlindungan fisik dan kimia terhadap paparan UVB tanpa mempengaruhi jalur produksi melanin seperti *tyrosinase* dan *TRP1*.<sup>7</sup>

Penggunaan antioksidan alami terbukti dapat menghambat sintesis melanin dan mencegah hiperpigmentasi.<sup>11</sup> Salah satu antioksidan alami yaitu ekstrak *Parkia speciosa* yang dikenal dengan nama petai atau *bitter bean*. Kulit *Parkia speciosa* mengandung senyawa-senyawa bioaktif seperti flavonoid dan tanin, yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi.<sup>12,13</sup> Senyawa polifenol kulit petai seperti *cinnamic acid*, *isoferulic acid*, *caffeic acid*, dan *ferulic acid* memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat degradasi melanosit sehingga tidak terjadi hipermelanogenesis.<sup>13,14</sup> Penelitian terdahulu melaporkan bahwa senyawa antioksidan dapat menghambat ekspresi *tyrosinase* dan *TRP1* pada sel melanosit sehingga tidak terjadi produksi melanin berlebihan.<sup>15</sup> Namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada model hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak yang mengandung flavonoid dan polifenol baik melalui aplikasi topikal maupun pemberian oral dapat mengurangi tingkat radikal bebas<sup>16</sup>, yang

memiliki potensi untuk membuktikan efek dari pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada kulit tikus yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB. Berdasarkan informasi tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada tikus galur wistar yang mengalami hiperpigmentasi akibat diinduksi sinar UVB.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

- a. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% terhadap penurunan ekspresi gen *tyrosinase* pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

- b. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit petai pada dosis 10% dan 20% terhadap penurunan ekspresi gen *TRP1* pada tikus jantan galur Wistar model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

#### 1.4. Manfaat penelitian

##### 1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada kasus hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.

##### 1.4.2. Manfaat Praktis

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

#### 1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Hwee-Leng siow, Gan Chee-Yuen, 2013 <sup>13</sup>	<i>Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from Parkia speciosa seeds</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Ekstrak petai memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC <sub>50</sub> 80.2 ug/ml

2	Nor-Hidayah Mustafa, Azizah Ugusman, Juriyati Jalil, Yusof Kamisah, 2018 <sup>17</sup>	<i>Anti-inflammatory property of Parkia speciosa empty pod extract in human embilical vein endothelial celss</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Ekstrak etanol <i>Parkia speciosa</i> dosis 25ug/ml memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan ekspresi Nf-kB p65, iNOS, COX-2, dan VCAM-1 pada sel HUVEC.
3	J S Gui, J Jalil, Z Jubri, Y Kamisah, 2019 <sup>18</sup>	<i>Parkia speciosa empy pod extract exerts anti-inflammatory properties by modulating NfκB and MAPK pathways in cardiomyocytes exposed to tumor necrosis factor-α</i>	Eksperimental, <i>in vitro</i>	Ekstrak <i>Parkia speciosa</i> 500ug/ml menurunkan ekspresi NF-kB p65, p38 MAPK, iNOS pada sel H9c2 cardiomyocytes
4	Zukhiroh, Agung Putra, Chodidjah, Titiek Sumarawati, Prosetyowa ti Subchan, Setyo Trisnadi, Nurul Hidayah, Nur Dina Amalina <sup>19</sup>	<i>Effect of Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats</i>	Eksperimental, <i>Invivo</i>	Induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur wistar dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm <sup>2</sup> sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan <i>spesifik staining</i> melanin pada hari ke 14.

---

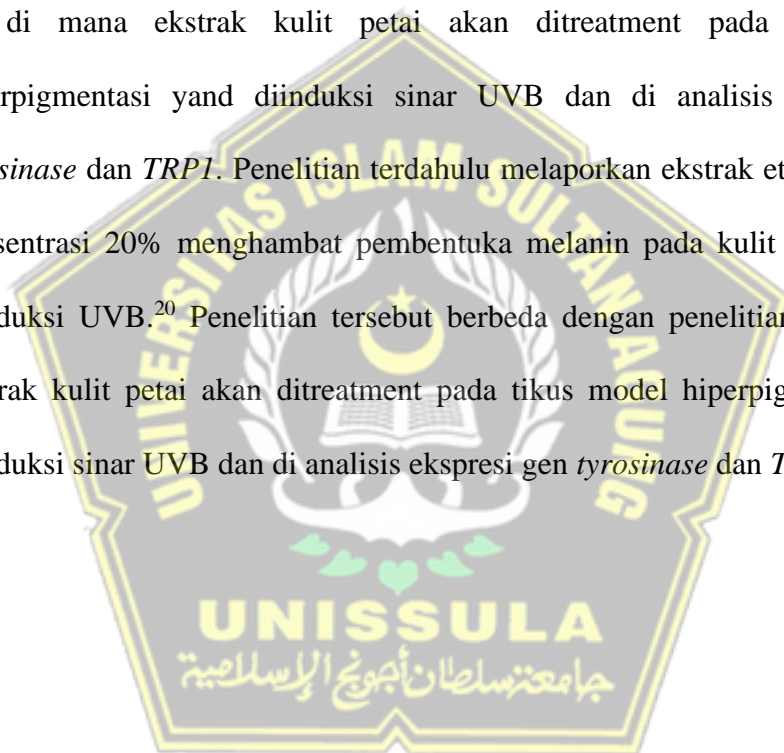
	<i>Pemberian Krim</i>		
	<i>Ekstrak Etanol Biji</i>		
	<i>Petai 20% sama</i>		
	<i>efektif dengan krim</i>		
	<i>hidrokuinon 4%</i>		Ekstrak etanol biji petai
	<i>dalam</i>	Eksperimental,	konsentrasi 20%
5	Irah Yunita	<i>menghambat</i>	<i>invivo</i>
	Iqbal <sup>20</sup>	<i>pembentukan</i>	menghambat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

---

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian ekstrak petai memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  80.2 ug/ml.<sup>13</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol *Parkia speciosa* dosis 25ug/ml memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan ekspresi NF-kB p65, iNOS, COX-2, dan VCAM-1 pada sel HUVEC.<sup>17</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa ekstrak *Parkia speciosa* 500ug/ml menurunkan ekspresi NF-kB p65, p38 MAPK, iNOS pada sel H9c2 cardiomyocytes.<sup>18</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana



ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur wistar dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm<sup>2</sup> sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan *spesifik staining* melanin pada hari ke 14.<sup>19</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*. Penelitian terdahulu melaporkan ekstrak etanol biji petai konsentrasi 20% menghambat pembentukan melanin pada kulit marmot yang diinduksi UVB.<sup>20</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana ekstrak kulit petai akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. *Tyrosinase*

*Tyrosinase* adalah enzim kunci yang terlibat dalam biosintesis melanin, dan peranannya dalam hiperpigmentasi telah menjadi fokus penelitian intensif dalam bidang dermatologi dan kosmetik. Proses sintesis melanin dimulai dengan transformasi asam amino tirosin menjadi DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) oleh enzim tirosinase.<sup>21</sup> *Tyrosinase* kemudian mengoksidasi DOPA menjadi DOPA-quinone, yang merupakan langkah kunci dalam pembentukan melanin. DOPA-quinone kemudian mengalami reaksi oksidasi, polimerisasi, dan modifikasi struktural untuk menghasilkan eumelanin (pigmen coklat-hitam) atau pheomelanin (pigmen kuning-merah). Perbedaan dalam jenis melanin yang dihasilkan ditentukan oleh kondisi lingkungan dan variasi genetik. Selain itu, *tyrosinase* juga berperan dalam mengatur jumlah dan distribusi melanosit, sel-sel yang menghasilkan melanin. Melanosit yang mengandung *tyrosinase* aktif dapat menghasilkan dan mengalirkan melanin ke keratinosit, sel-sel yang membentuk lapisan terluar kulit. Proses ini penting untuk memberikan pigmen kepada jaringan yang membutuhkan, seperti epidermis, rambut, dan retina.<sup>19,22</sup>

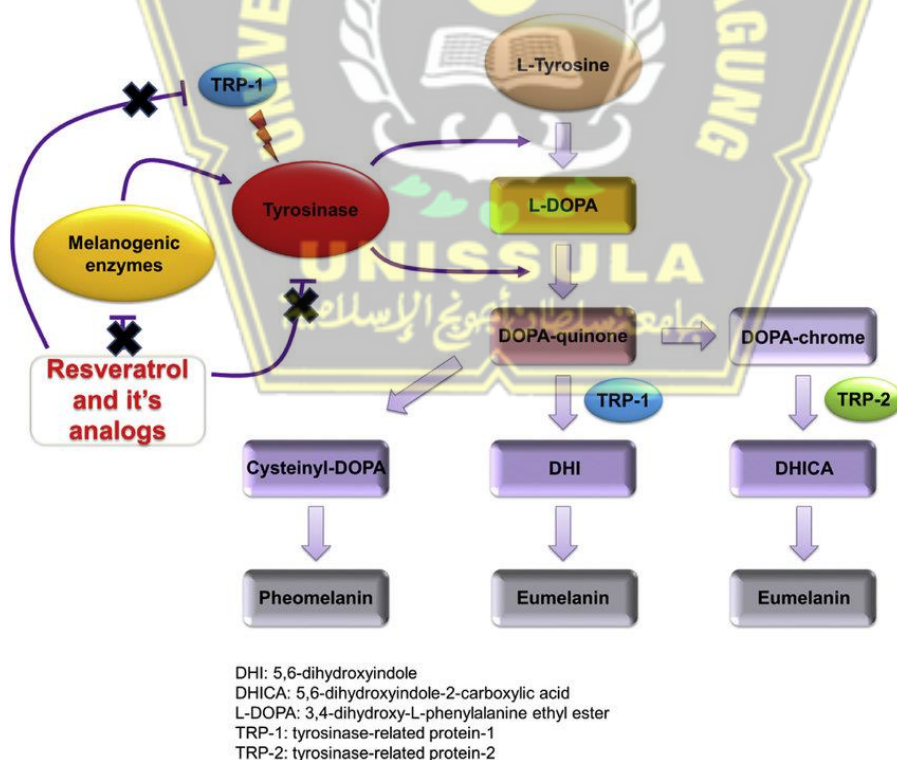
Pengaturan aktivitas *tyrosinase* sangat kompleks dan melibatkan banyak faktor eksternal dan internal. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas *tyrosinase* meliputi paparan sinar ultraviolet (UV), hormon, peradangan, dan faktor genetik. Stres oksidatif juga dapat mempengaruhi aktivitas *tyrosinase* dengan mengubah kondisi redoks dalam sel. Gangguan dalam sintesis atau regulasi *tyrosinase* dapat menyebabkan gangguan pigmentasi, termasuk hiperpigmentasi atau hipopigmentasi. Hiperpigmentasi terjadi ketika produksi melanin berlebihan, sedangkan hipopigmentasi terjadi ketika produksi melanin kurang atau tidak ada sama sekali. Gangguan genetik dalam *tyrosinase* atau faktor regulasi terkait telah

dikaitkan dengan kondisi pigmentasi kulit yang abnormal, seperti albinisme dan vitiligo.<sup>2,23,24</sup>

Strategi penghambatan *tyrosinase* telah digunakan dalam produk pemutih kulit untuk mengurangi hiperpigmentasi, sementara peningkatan aktivitas *tyrosinase* telah digunakan dalam produk perawatan rambut untuk mendorong produksi melanin dan mengatasi kebotakan. Studi lebih lanjut tentang regulasi molekuler *tyrosinase* dan interaksi dengan faktor lain akan memberikan wawasan yang lebih dalam tentang sintesis melanin dan mekanisme yang terlibat dalam kondisi pigmentasi kulit yang abnormal.<sup>25</sup> Beberapa mekanisme yang terlibat dalam aktivasi *tyrosinase* dalam hiperpigmentasi antara lain:<sup>26,27</sup>

- a. Paparan sinar ultraviolet (UV): Sinar UV dari sinar matahari merupakan salah satu faktor utama yang memicu aktivasi *tyrosinase*. Paparan UV meningkatkan produksi melanin dengan menginduksi ekspresi dan aktivitas *tyrosinase*. Radiasi UV dapat merangsang jalur sinyal yang mengaktifkan faktor transkripsi seperti *MITF* (Microphthalmia-associated transcription factor), yang merupakan regulator utama dalam ekspresi gen *tyrosinase*.
- b. Faktor inflamasi: Inflamasi kronis pada kulit, seperti dermatitis atau luka, dapat mempengaruhi aktivasi *tyrosinase*. Faktor inflamasi, seperti sitokin dan mediator inflamasi, dapat meningkatkan ekspresi *tyrosinase* dan merangsang melanosit untuk menghasilkan lebih banyak melanin. Interaksi kompleks antara faktor inflamasi dan jalur sinyal *tyrosinase* menyebabkan hiperpigmentasi pasca-inflamasi.<sup>28</sup>

- c. Hormonal: Perubahan hormonal juga dapat mempengaruhi aktivasi *tyrosinase*. Contohnya, dalam kondisi kehamilan, peningkatan kadar hormon estrogen dapat merangsang produksi melanin dengan mengaktifkan *tyrosinase*. Ini dapat menyebabkan munculnya hiperpigmentasi seperti kloasma atau mask of pregnancy.
- d. Faktor genetik: Variasi genetik dalam gen *tyrosinase* atau gen terkait lainnya juga dapat berkontribusi terhadap aktivasi *tyrosinase* dan hiperpigmentasi. Mutasi dalam gen *tyrosinase* atau gen yang terlibat dalam regulasi ekspresi *tyrosinase* dapat mengganggu pengaturan normal sintesis melanin dan menyebabkan hiperpigmentasi herediter seperti albinisme dan beberapa bentuk vitiligo.



Gambar 2.1. Peran enzim *tyrosinase* pada proses pembentukan melanin<sup>29</sup>

## 2.2. Tyrosinase-related protein-1 (*TRP1*)

### 2.2.1. Definisi

Enzim TRP dibagi menjadi 2 sub family TRP-1 dan TRP-2. Protein *TRP1*, adalah enzim yang pada manusia dikodekan oleh gen *TRP1* atau *Tyrp1*. *TRP1* adalah produk gen spesifik melanosit yang terlibat dalam sintesis melanin. Sementara sebagian besar *TRP1* memiliki aktivitas dihydroxyindole carboxylic acid oxidase, fungsi dalam melanosit manusia kurang jelas. Selain perannya dalam sintesis melanin, *TRP1* terlibat dalam menstabilkan protein tirosinase dan memodulasi aktivitas katalitiknya. *TRP1* juga terlibat dalam pemeliharaan struktur melanosom dan mempengaruhi proliferasi melanosit dan kematian sel melanosit.<sup>30</sup> Dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, TRP 2), juga dikenal sebagai DCT, adalah gen manusia. Ekspresinya diatur oleh faktor transkripsi terkait mikroftalmia (*MITF*).<sup>31</sup>

### 2.2.2. Peran *TRP1* pada Hiperpigmentasi

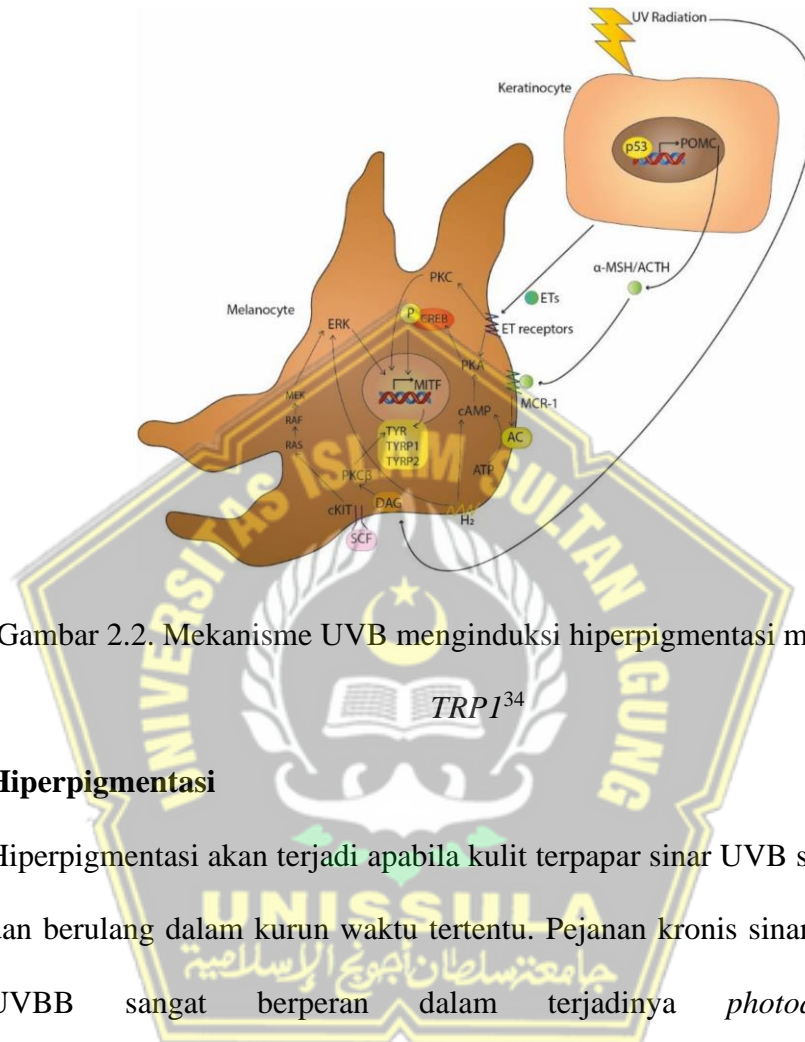
TRP merupakan enzim pembatas laju untuk mengendalikan produksi melanin terutama terlibat dalam dua reaksi yang berbeda dari sintesis melanin: (1) hidrosilasi monofenol, dan (2) konversi o-difenol menjadi o-kuinon yang sesuai. o-quinone mengalami beberapa reaksi untuk akhirnya membentuk melanin. Sintesis melanin dalam sel

melanositik pada akhirnya diatur oleh tirosinase, suatu glikoprotein yang mengandung tembaga yang terikat membran, yang merupakan enzim penentu kecepatan pembentuk melanin.<sup>32</sup> Tirosinase hanya diproduksi oleh sel melanositik, dan mengikuti sintesisnya dan pemrosesan selanjutnya di retikulum endoplasma dan Golgi, untuk selanjutnya di transfer dan diproses pada ke organel khusus, disebut melanosom, di mana pigmen disintesis dan disimpan. Di dalam kulit dan rambut, melanosom ditransfer dari melanosit ke keratinosit tetangga dan didistribusikan di jaringan tersebut untuk menghasilkan warna yang terlihat.

Enzim tirosinase mengubah asam amino, asam tirosin menjadi dihidroksifenilalanin (DOPA) dan menjadi bentuk kuinoidnya, DOPA quinone, yang merupakan dasar pembentukan kedua jenis melanin, eumelanin (coklat tua) dan pheomelanin (kuning kemerahan).<sup>4</sup> Kombinasi keduanya jenis bertanggung jawab untuk warna kulit, yang bervariasi dari kulit ke kulit. Tirosinase dikendalikan oleh radiasi UV dan diinduksi oleh  $\alpha$ -MSH.<sup>32</sup> Stimulator tirosinase lebih lanjut adalah -endorfin. Terkait endorfin zat dapat ditemukan dalam ekstrak sayuran dan bersama-sama dengan asetil tirosin sintetis, prodrug tirosin, mereka mampu menginduksi pembentukan melanin independen UV. Paparan radiasi UV akan mempercepat dan merangsang proses pembentukan melanin.<sup>15</sup> Kompleks zymo-tan, aktivator penyamakan, terdiri dari tirosin asam amino (prekursor melanin) dan tirosinase.



Tirosinase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan melanin dengan adanya radiasi matahari.<sup>33</sup>

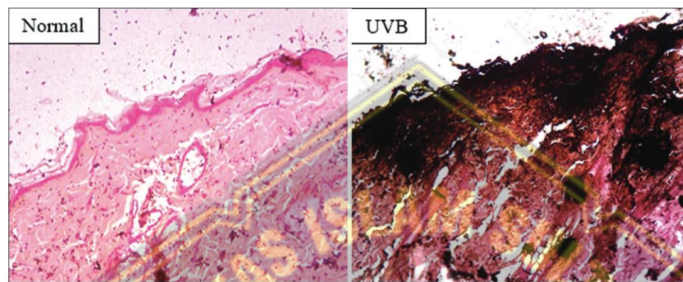


Gambar 2.2. Mekanisme UVB menginduksi hiperpigmentasi melalui peran  $TRP1$ <sup>34</sup>

### 2.3. Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UVBA dan UVBB sangat berperan dalam terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*.<sup>35</sup> Kerusakan kulit pada hiperpigmentasi dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami hiperpigmentasi dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna.<sup>8</sup> Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi

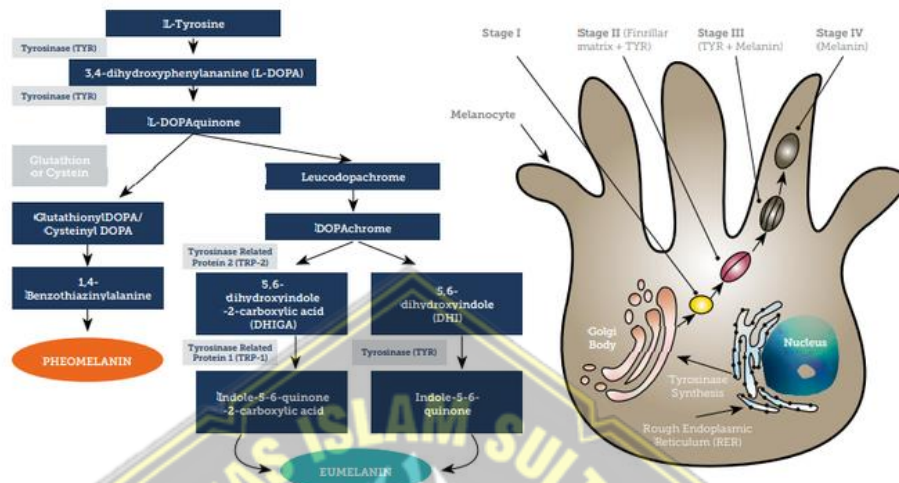
penuaan kulit berupa kerutan (*wrinkle*), hilangnya elastisitas, kekenduran (*sagging*) dan pigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar. Validasi hiperpigmentasi dapat dilakukan dengan pengecatan fontana-masson yang akan menghasilkan warna hitam pada bagian epidermis (gambar 2.3).<sup>19</sup>



Gambar 2.3. Validasi jumlah melanin dengan Fontana-Masson<sup>19</sup>

Dua regulator utama pada proses pembentukan kolagen oleh sel fibroblas adalah transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) dan activator protein (AP-1). TGF- $\beta$  merupakan sitokin yang merangsang produksi kolagen, sedangkan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. Penuaan ekstrinsik yang terutama disebabkan oleh radiasi sinar UVB (hiperpigmentasi) akan menyebabkan peningkatan produksi ROS pada lapisan dermis. ROS tersebut akan memicu serangkaian reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1 yang akan menstimulasi proses transkripsi enzim MMP yang berperan dalam proses degradasi kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- $\beta$ . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan

menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit.<sup>36-39</sup>



Gambar 2.4. Mekanisme pembentukan melanin akibat paparan sinar UVB<sup>40</sup>

## 2.4. Ekstrak Kulit Petai

### 2.4.1. Definisi Ekstrak Kulit Petai

Kulit petai (*Parkia speciosa*) merupakan bagian dari tanaman petai yang mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder. Kulit petai dalam 100 gramnya terdapat 91 kalori, 0,37 gram lemak, 16,62 gram karbohidrat, dan 6,58 gram protein. Biji petai juga mengandung banyak nilai gizi seperti protein, lemak, karbohidrat, dan sumber mineral yang baik. Bijinya juga mengandung vitamin E dan vitamin C yang cukup banyak. Di antara empat belas jenis sayuran yang umum dikonsumsi, biji *Parkia speciosa* memiliki kandungan thiamin tertinggi (vitamin B1 2,8 g/g).<sup>17</sup> Tingginya konsentrasi tannin terdeteksi di kulit petai dan bijinya dibandingkan dengan bagian lainnya. Menurut Seidemann (2005), petai (*Parkia speciosa* Hassk.) termasuk suku Mimosaceae dengan klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Magnoliophyta  
 Kelas : Magnoliopsida  
 Ordo : Capparales  
 Famili : Fabales  
 Genus : Mimosaceae  
 Spesies : *Parkia speciosa* Hassk.



Gambar 2.5. Biji dan kulit petai

#### 2.4.2. Kandungan Senyawa Aktif Kulit Petai

Kulit petai mengandung hampir semua senyawa kimia seperti terpenoid, yang terdeteksi yaitu  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol, campesterol, dan squalene. Lupeol yang ditemukan memiliki sifat antikarsinogen, antinosisseptif, dan anti-inflamasi. Pada uji kolorimetri ekstrak etanol kulit petai di deteksi kandungan flavonoid (20,3 mg RE/g)<sup>41</sup> seperti quercetin, myricetin, luteolin, kaempferol, atau apigenin. Senyawa saponin juga ditemukan pada tanaman tersebut.<sup>14</sup>

Flavonoid yang memiliki sifat antioksidan terdeteksi dalam ekstrak etanol kulit petai, tetapi tidak ditemukan dalam ekstrak metanolnya. Kulit petai memiliki kandungan antioksidan yang tinggi terutama jumlah total fenoliknya. Kandungan fenolik memiliki banyak potensi yang dapat dikembangkan sebagai fitomedis. Kedua senyawa ditemukan lebih tinggi pada ekstrak etanol daripada ekstrak metanol, yang bisa disebabkan lebih banyak senyawa hidrofobik yang



dipertahankan dalam etanol dibandingkan dengan ekstrak metanol. Ada berbagai faktor yang dapat mempengaruhi kandungan atau komposisi kimia pada tumbuhan seperti jenis, cara pengambilan, kondisi penyimpanan, musim dan umur bagian tumbuhan pada saat panen serta faktor geografis. Pada penelitian lain menunjukkan ekstrak etanol kulit petai memiliki kandungan fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak aqueous, dimana ekstrak etanol lima kali lebih tinggi kandungannya dibandingkan ekstrak aqueous.<sup>14</sup>

Paparan UVB diketahui dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan faktor inflamasi yang dapat berujung pada penurunan kolagen hingga terjadinya penuaan dini akibat dari peningkatan enzim matrix metalloproteinase MMP dan penurunan TGF- $\beta$ .<sup>42</sup> Peningkatan enzim MMP akan mendegradasi kolagen pada kulit sehingga menyebabkan hilangnya kekenyalan kulit serta timbulnya kerutan pada kulit. Faktor pertumbuhan TGF- $\beta$  merupakan faktor kunci dalam aktivasi sel fibroblas untuk memproduksi kolagen, sehingga penurunan TGF- $\beta$  berujung pada penurunan densitas kolagen.<sup>43,44</sup>

Kandungan beberapa jenis flavonoid dalam kulit petai diketahui mampu menghambat jalur NF- $\kappa$ B, berujung pada penekanan faktor inflamasi termasuk TNF- $\alpha$  yang berperan dalam peningkatan enzim MMP. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa pemberian flavonoid



and polifenol mampu meningkatkan densitas kolagen dan mencegah produksi melanin berlebihan pada kulit yang terpapar UVB.<sup>45</sup>

Berdasarkan penelitian terdahulu Paparan UVB dapat menginduksi produksi ROS yang merupakan radikal bebas pemicu pelepasan beberapa faktor inflamasi termasuk TNF alpha, IL-6, IL-1 yang berakibat pada peningkatan enzim matrix metalloproteinase (MMP) serta penurunan densitas kolagen. Peningkatan produksi MMP-3 juga dapat berakibat pada aktivasi  $\alpha$ -SMA yang merupakan protein kunci dalam apoptosis sel, termasuk sel fibroblast yang merupakan sel utama memproduksi kolagen. Peningkatan enzim MMP serta penurunan populasi sel fibroblast akan menyebabkan berkurangnya densitas kolagen pada kulit sehingga berujung pada hilangnya kekenyalan kulit hingga timbulnya kerutan pada kulit. Hingga saat ini kajian mengenai peran kulit petai dalam memperbaiki kulit yang mengalami penuaan dini akibat paparan UVB masih jarang dilakukan. Namun berdasarkan profil kandungan senyawa kimia pada terdapat kulit petai kemungkinan dapat memperbaiki kulit yang mengalami penurunan kolagen. 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 IL1. Penurunan faktor inflamasi ini akan berkorelasi pada penurunan produksi enzim MMP sehingga degradasi kolagen terhenti.<sup>46</sup>

## 2.5. Efek Kulit Petai Terhadap Ekspresi Gen *Tyrosinase* dan *TRP1*

Ekstrak kulit petai mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tannin, triterpenoid, dan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat sehingga berpotensi mencegah pembentukan melanin.<sup>18</sup> Senyawa antioksidan dapat mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi enzim *tyrosinase* dan *TRP1*.<sup>47</sup> Senyawa antioksidan seperti flavonoid dan polifenol terbukti menginduksi aktivasi jalur PI3K/Akt yang akhirnya meninhibisi aktivasi *tyrosinase* pada sel melanoma.<sup>48</sup> Disisi lain senyawa antioksidan juga dapat menghambat jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi enzim *tyrosinase* dan *TRP1*.<sup>4,15</sup> Penggunaan senyawa terpenoid juga dapat mencegah aktivasi jalur *MITF* yang menyebabkan *tyrosinase* tidak aktif dan berdampak pada pencegahan produksi melanin berlebihan.<sup>46</sup>

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa flavonoid secara langsung mampu menghambat ekspresi NF-kB yang secara signifikan menghambat jalur PI3K sehingga terjadi hambatan produksi melanin pada melanosom.<sup>49,50</sup> Kandungan flavonoid juga dapat bersifat antiinflamasi sehingga menghambat pembentukan melanin akibat aktivasi protein p53 tidak terbentuk.<sup>51</sup> Studi tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit petai yang mengandung berbagai metabolit sekunder dapat menghambat ekspresi *tyrosinase* dan *TRP1* pada hiperpigmentasi. Maka

dengan adanya ekstrak kulit petai merupakan kandidat yang mampu mencegah hiperpigmentasi.



## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

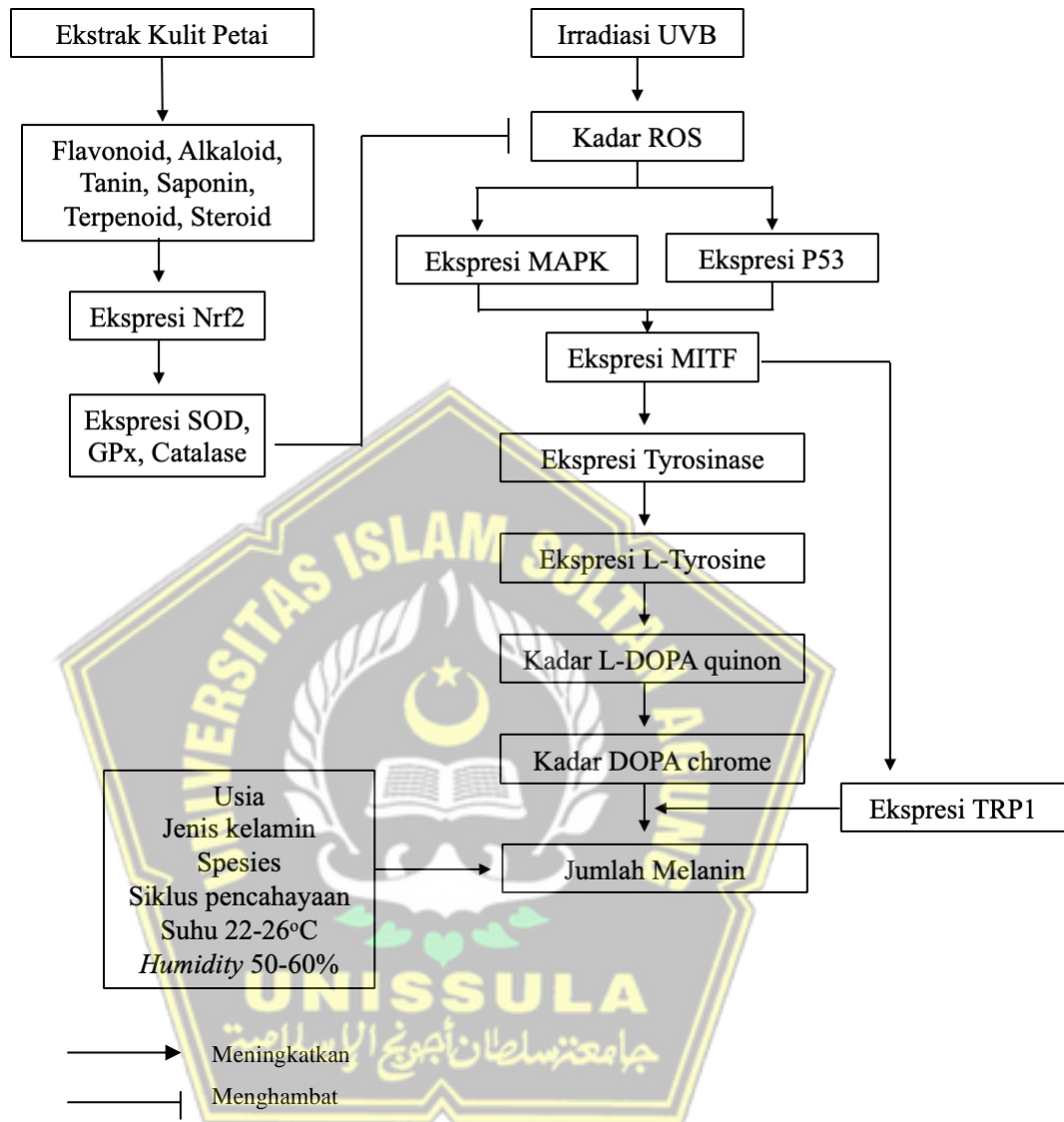
#### 3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB menginduksi produksi ROS yang kemudian akan mengaktivasi MAPK pathway dan meningkatkan ekspresi p53. Aktivasi p53 dan MAPK akan mengatur ekspresi *MITF*. Aktivasi *MITF* ini menyebabkan produksi enzim *tyrosinase* meningkat, peningkatan produksi enzim ini akan mempercepat perubahan L-tyrosine menjadi L-DOPA yang merupakan sumber utama terbentuknya melanin.<sup>50</sup> L-Tyrosine yang banyak terakumulasi akibat paparan sinar UVB akan dirubah menjadi L-DOPA oleh enzyme *tyrosinase*. L-DOPA dengan katalis yang sama akan berubah menjadi bentuk dopaquinone.<sup>31,52</sup> L-DOPA akan berubah menjadi bentuk DOPA chrome dengan adanya *TRP1* dan akhirnya membentuk melanin menjadi pigmen hitam pada kulit.<sup>4</sup> *TRP1* memiliki variasi genetik untuk berkerja bersama tyrosinase dan dopachrome isomerase activity untuk menginduksi sintesis melanin.<sup>53</sup>

Ekstrak kulit petai diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid, steroid, triterpenoid, dan polifenol yang berperan sebagai antioksidan.<sup>54</sup> Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat produksi ROS dengan meningkatkan produksi enzim antioksidan SOD, GPx dan katalase pada kulit akibat paparan UVB melalui aktivasi Nrf2 sehingga dapat mencegah terjadinya hiperpigmentasi.<sup>55,56</sup>

Penurunan kadar ROS ini dapat mengaktifasi *MITF* pathway dan mengurangi produksi enzim *tyrosinase* dan *TRP1* sehingga sintesis melanin tidak terbentuk.<sup>57</sup>

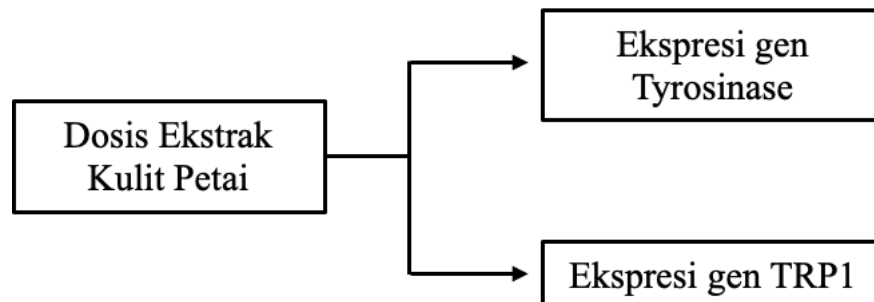




**Gambar 3.2.** Kerangka Teori



### 3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.3. Kerangka Konsep

### 3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit petai terhadap penurunan ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* pada tikus jantan galur *Wistar* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

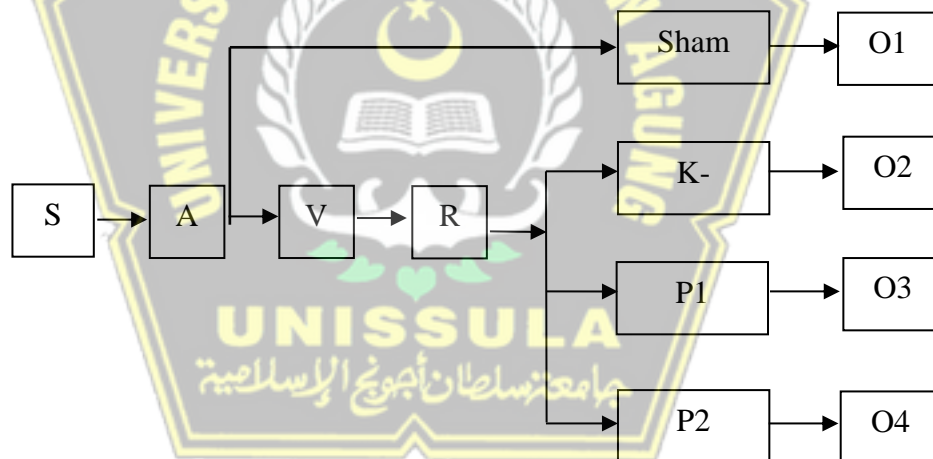


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



**Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian**

Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

- Perlakuan : Sham : Tikus Sehat
- Perlakuan : K-: Kontrol Negatif (Tikus model hiperpigmentasi dengan induksi sinar UVB tanpa pemberian terapi)
- Perlakuan : P1: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian ekstrak kulit petai dosis 10% sebanyak 200mg/tikus.
- Perlakuan : P2: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian ekstrak kulit petai dosis 20% sebanyak 200mg/tikus.
- O : Observasi

## 4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1. Variabel Penelitian

#### 4.2.1.1. Variabel bebas

Ekstrak kulit petai yang di berikan secara topikal.

#### 4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1*.

### 4.2.2. Defenisi Operasional

#### 4.2.2.1. Ekstrak kulit petai

Ekstrak kulit petai adalah cairan kental hasil ekstraksi kulit petai kering dengan metode remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dikentalkan dengan *rotary vacum evaporator*. Ekstrak

kulit petai dibuat dalam sediaan topical dengan dosis 10% dan 20%.

Satuan: gram

Skala: rasio

#### 4.2.2.2. Ekspresi *tyrosinase*

Ekspresi gen *tyrosinase* adalah rasio ekspresi gen katalis untuk merubah L-tyrosine menjadi L-DOPA pada sel melanosome pada proses pembentukan melanin yang teraktivasi pada hari 14 setelah awal pemberian perlakuan yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level *tyrosinase*/GAPDH

Skala: rasio

#### 4.2.2.3. Ekspresi gen *TRPI*

Ekspresi gen *TRPI* adalah gen yang memiliki peran dalam pembentukan melanin untuk merubah dihydroxyindole carboxylic acid menjadi indolequinone carboxylic acid.

Ekspresi gen *TRPI* dianalisis dari jaringan kulit pada hari ke 14 setelah awal pemberian perlakuan yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level *TRPI* /GAPDH

Skala: rasio

### **4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian**

#### **4.3.1. Subjek Penelitian**

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang dipapar sinar UVB sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm<sup>2</sup> yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 15 cm.

#### **4.3.2. Sampel Penelitian**

##### **4.3.2.1. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tikus putih jantan galur wistar yang terpapar sinar UVB dengan panjang gelombang sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm<sup>2</sup> yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 15 cm terhadap punggung tikus yang dicukur bulunya. Tikus terkonfirmasi terjadi peningkatan kadar melanin.

2. Kondisi sehat.
3. Berat badan 200-250 gram.

##### **4.3.2.2. Kriteria Eksklusi**

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

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

#### 4.3.2.3. Kriteria Drop Out

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

#### 4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

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

#### 4.3.4. Besar Sampel

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 6$$



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

#### **4.4. Alat dan Bahan**

##### **4.4.1. Alat**

Pelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 390 mJ/cm<sup>2</sup>, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

##### **4.4.2. Bahan**

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

#### **4.5. Cara Penelitian**

##### **4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance***

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

#### 4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Kulit Petai

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

#### 4.5.3. Pemeriksaan Kandungan Alkaloid

Pemeriksaan kandungan alkaloid menggunakan pemeriksaan Wagner. Prosedur pemeriksaan Wagner:

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

#### 4.5.4. Pemeriksaan Kandungan Saponin

Pemeriksaan kandungan saponin menggunakan pemeriksaan Forth.

Prosedur pemeriksaan Forth adalah:

1. Ekstrak kulit petai sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 10 mL akuades
3. Dikocok selama 30 detik
4. Diamati perubahan yang terjadi.
5. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

#### 4.5.5. Pemeriksaan Kandungan Tanin

Pemeriksaan kandungan tanin menggunakan pemeriksaan  $\text{FeCl}_3$  1%.

Prosedur pemeriksaan  $\text{FeCl}_3$  1% adalah:

1. 3 mL ekstrak kulit petai dicampur aquades panas
2. Ddinginkan ekstrak
3. Tambahkan 5 tetes  $\text{NaCl}$  10% dan disaring.
4. Filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%
5. Diamati perubahan yang terjadi.
6. Apabila filtrat mengalami perubahan warna maka identifikasi menunjukkan adanya tannin

#### 4.5.6. Pemeriksaan Kandungan Flavonoid

Pemeriksaan kandungan flavonoid menggunakan pemeriksaan

Wilstater. Prosedur pemeriksaan Wilstater adalah:

1. Sebanyak 3 mL ekstrak kulit petai diuapkan,
2. Dicuci dengan heksana sampai jernih.
3. Residu dilarutkan dalam 20 mL etanol kemudian disaring.
4. Filtrat ditambahkan 0,5 mL HCl dan logam Mg
5. Diamati perubahan warna yang terjadi
6. Perubahan warna filtrat dari merah tua hingga jingga menunjukkan adanya flavonoid.

#### **4.5.7. Pemeriksaan Kandungan Steroid dan Triterpenoid**

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

1. Ekstrak diuapkan sampai kering.
2. Kemudian ditambahkan kedalamnya 10 mL heksana
3. Diaduk selama beberapa menit lalu biarkan.
4. Selanjutnya diuapkan diatas penangas air dan ditambahkan 0,1 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat lalu diaduk.
5. Larutan disaring sehingga diperoleh filtrat.
6. Kemudian filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi asam asetat glasial dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Perubahan warna menjadi merah hingga ungu menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid.

#### 4.5.8. Pemeriksaan Flavonoid Total Ekstrak Kulit Petai

##### 4.5.8.1. Pembuatan Kurva Standar Quersetin

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

1. Pembuatan variasi konsentrasi larutan quersetin sebesar 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/L:
2. Masing-masing larutan diambil sebanyak 2 mL
3. Ditambahkan 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 0,1 mL  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1 M.
4. Campuran didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit
5. Dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum pada salah satu konsentrasi.
6. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengukur absorbansi dari masing-masing fraksi

##### 4.5.8.2. Penentuan Total Flavonoid Ekstrak Kulit Petai

Penentuan total flavonoid pada ekstrak kulit petai adalah:

1. Masing-masing fraksi ditimbang 0,06 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol.
2. Larutan tersebut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 0,1 mL  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1 M.
3. Campuran didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang.

4. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 433 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
5. Hasil pengukuran panjang gelombang ini kemudian dibandingkan dengan kurva standar quersetin.

#### **4.5.9. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB**

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



#### **4.5.10. Validasi Peningkatan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin**

Jaringan kulit di potong secara membujur dengan *scalpel blade* no.20 sebesar 2x2cm untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Fontana-Masson dengan tahapan pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64°C. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide di hematigoksin besi weigert selama 5 menit. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit dan inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit dan diamati di bawah mikroskop. Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan di bandingkan kelompok sehat berdasarkan penelitian sebelumnya (Gambar 2.3).<sup>19</sup>

#### **4.5.11. Pengambilan Sampel Jaringan**

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke 14 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit

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

#### **4.5.12. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen *Tyrosinase* dan *TRP1* menggunakan RT-PCR**

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA<sup>58</sup> 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 *tyrosinase* dan *TRP1* di amplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel.

PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.

**Tabel 4.1.** Komponen PCR Mix

<b>Komponen</b>	<b>Jenis</b>	<b>Sekuens</b>
Primer	Forward <i>Tyrosinase</i>	5'- AATCGCTTAGGTAAGAA- 3
	Reverse <i>Tyrosinase</i>	5'- GTTGCTGAGGTATCGCCA GGAA-3'
Primer	Forward <i>TRP1</i>	5'- GCTTAAATTGCCAATTGA ATA-3'
	Reverse <i>TRP1</i>	5'- AGGGAGGGGACTTATCT G-3'
Reagen	Trizol Reagen	
RNA transcribed	High Capacity cDNA Reverse Transcription	
cDNA	SYBR Green	

- Perhitungan ekspresi gen *tyrosinase* dan *TRP1* dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.

#### 4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Integrated Biomedical Laboratory, Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Semarang, Jawa Tengah. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Analisa qRT-PCR dilakukan di laboratorium Stem Cell and Cancer Research Indonesia. Penelitian dilakukan pada Agustus – September 2023.

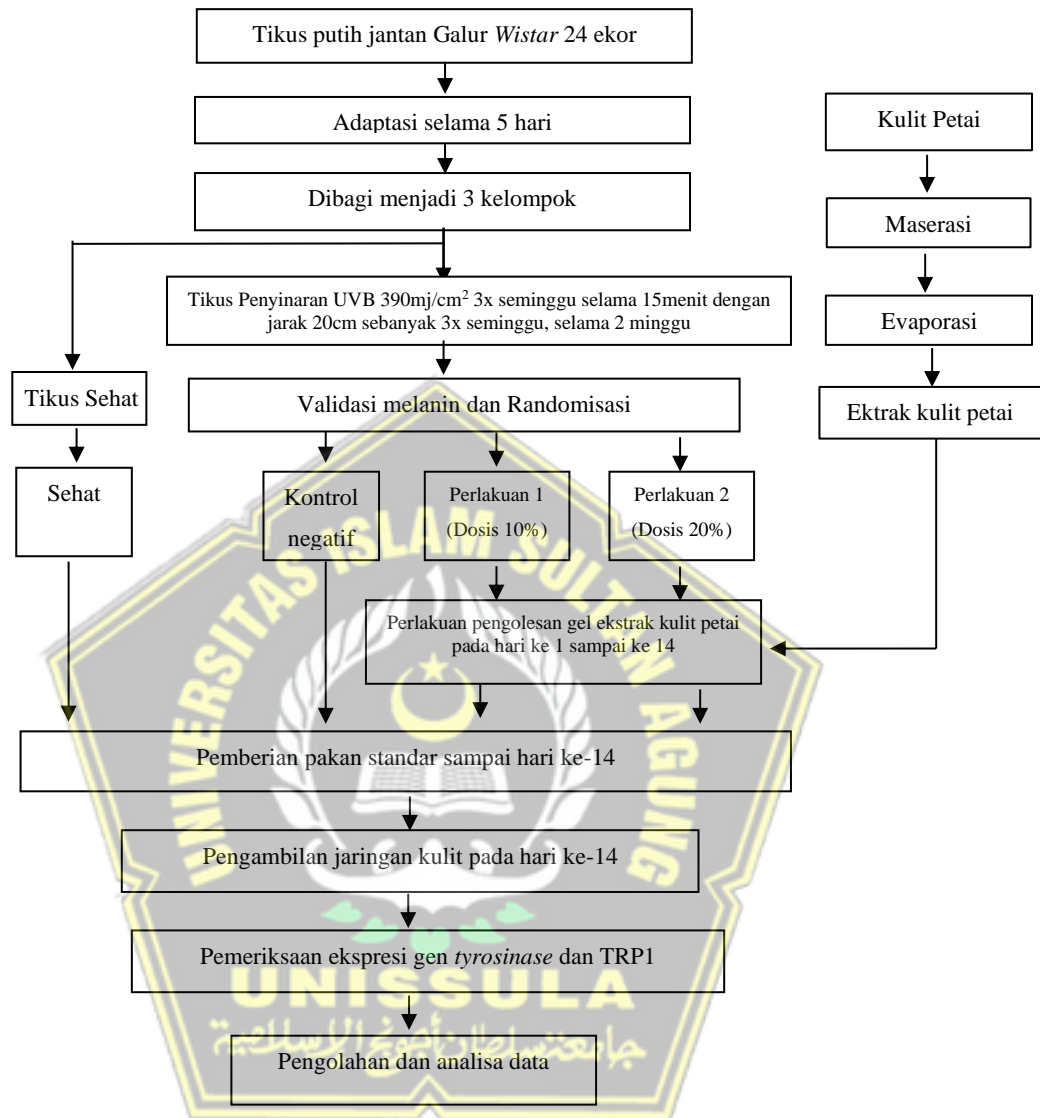
#### 4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Didapatkan sebaran dan varian data normal ( $p > 0,05$ ) dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ) pada data ekspresi gen tyrosinase maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Hasil *Anova* terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pada data ekspresi gen TRP1 didapatkan sebaran dan varian data tidak normal ( $p < 0,05$ ) dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji beda *Kruskal Wallis*. Terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui

signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



#### 4.8. Alur Penelitian



**Gambar 4.3.** Alur Penelitian



## **BAB V**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 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/cm<sup>2</sup> selama tiga kali seminggu sepanjang dua minggu<sup>16</sup>. 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**

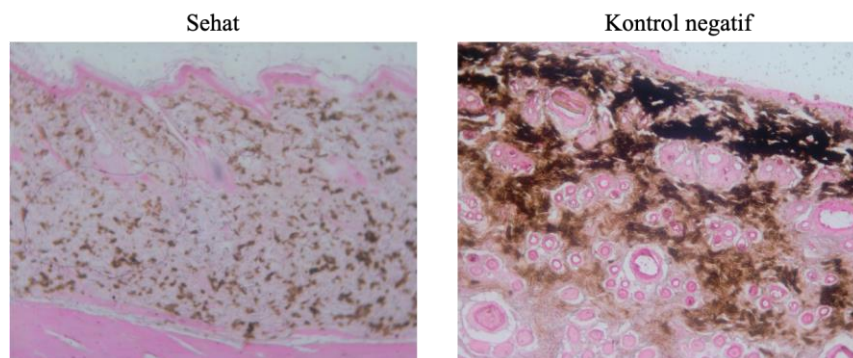
##### **5.1.1 Ekstraksi Kulit Petai**

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

### 5.1.2 Validasi Model Hiperpigmentasi

Pada penelitian ini menggunakan model hiperpigmentasi. Hewan model diinduksi hiperpigmentasi dengan irradiasi UVB 302 nm dengan intensitas energi  $390\text{mJ}/\text{cm}^2$  selama tiga kali seminggu sepanjang dua minggu. Validasi hiperpigmentasi diamati pada hari ke 14 pada satu tikus sehat dan satu tikus kontrol negatif (K2). 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 irradiasi UVB. Perbesaran 100x.

### 5.1.3 Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen Tyrosinase

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu menurunkan ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.2).

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen tyrosinase dan TRP1

Variabel	Kelompok				pvalue
	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 Tyrosinase <i>Saphiro wilk</i>	1,00±0,01	17,92±3,77	3,19±2,12	0,65±0,44	
<i>Levene test</i>					0,001
<i>One way ANOVA</i>					0,001***
Ekspresi gen TRP1	1,01±0,01	35,91±4,52	4,96±3,42	2,22±1,18	

<i>Saphiro wilk</i>	0,421	0,448	0,017*	0,158	
<i>Levene test</i>					0,001
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0,001***

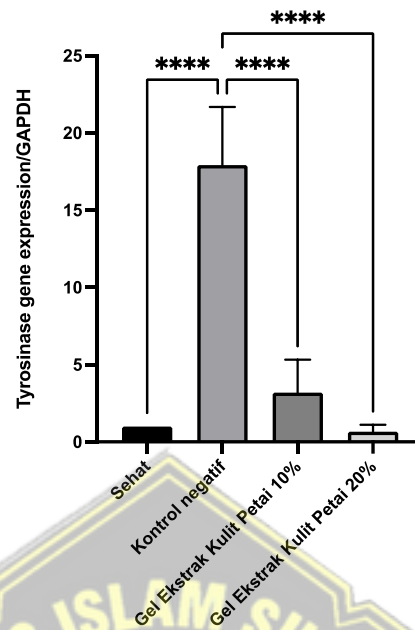
Keterangan :

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

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

\*\*\* Krsuskal Wallis/ one way ANOVA ( $p < 0,05$  = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1. Rerata ekspresi gen tyrosinase dikelompok K4 yang terendah ( $0,65 \pm 0,44$ ), kemudian di ikuti oleh rerata ekspresi gen tyrosinase kelompok K3 ( $3,19 \pm 2,12$ ). Rasio tertinggi pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K2) sebesar  $17,92 \pm 3,77$ . Data ekspresi gen tyroisnase 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 tyrosinase normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen tyrosinase 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 tyrosinase Pada Seluruh Kelompok Penelitian

Tabel 5.2. Uji *post hoc* Tamhane ekspresi gen tyrosinase pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2	0,001*	-43,285	-29,827
	K3	0,203	-9,807	1,927
	K4	0,288	-3,243	0,827
K2	K3*	0,001*	25,642	39,590
	K4	0,001*	28,864	41,839
K3	K4*	0,513	-2,884	8,348

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

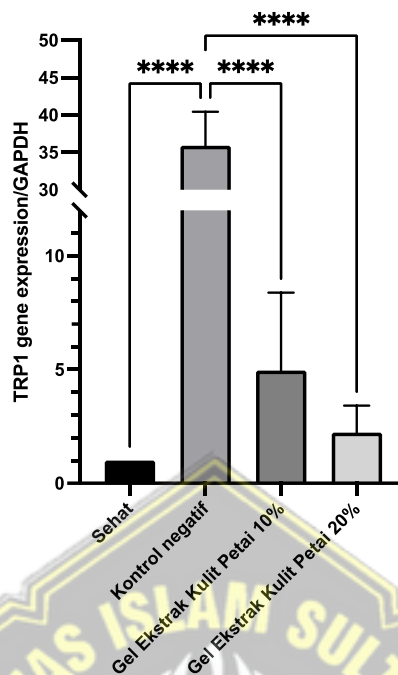
Berdasarkan data diatas didapatkan rerata perbandingan antara kelompok K2 dengan K3 (0,001) dan K2 dengan K4 (0,001) yang menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan perbandingan kelompok K3 dan K4 (0,513)

tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan K1 dan K2 diperoleh nilai 0,001 ( $p < 0,05$ ) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Penurunan ekspresi gen tyrosinase paling signifikan ditunjukkan pada pemberian ekstrak kulit petai 20% dengan nilai batas bawah -2,884 dan nilai batas atas 8,348. Hasil uji *post hoc Tamhane* pada data ekspresi gen tyrosinase menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat menurunkan ekspresi gen tyrosinase pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

#### **5.1.4 Efek Pemberian Gel Ekstrak Kulit Petai Dosis 10% dan 20% Terhadap Ekspresi Gen TRP1**

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel ekstrak kulit petai mampu menurunkan ekspresi gen TRP1 pada tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.3). Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.1. Rerata ekspresi gen TRP1 dikelompok K4 ( $2,22 \pm 1,18$ ) yang terendah, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen TRP1 kelompok K3 ( $4,96 \pm 3,42$ ). Data ekspresi gen TRP1 tertinggi yaitu pada kelompok kontrol negatif sebesar  $35,91 \pm 4,52$ . Data ekspresi gen TRP1 kelompok K1, K2, dan K4 berdistribusi normal, namun data kelompok K3 ( $p < 0,005$ ) tidak terdistribusi normal berdasarkan hasil *Shapiro Wilk*. Distribusi data ekspresi gen TRP1 tidak normal, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen TRP1 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal-Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.





Gambar 5.3. Grafik ekspresi gen TRP1 pada seluruh kelompok penelitian

Tabel 5.2. Uji *Mann-Whitney* TRP1 pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K1	K2*	0,001	0,225	0,771
	K3	0,677	-2,538	0,135
	K4	0,272	-2,528	0,315
K2	K3*	0,000	-3,002	-2,887
	K4*	0,000	-2,992	-2,215
K3	K4	0,090	-1,373	1,563

Tanda \* menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan perbandingan rerata K2 (kontrol negatif) dengan K3 (gel ekstrak kulit petai 10%) (0,000) dan K4 (gel ekstrak kulit petai 20%) (0,000) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan K3

dan K4 (0,090) 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 ekspresi gen TRP1 tertinggi paling signifikan ditunjukkan pada pemberian gel ekstrak kulit petai 20% dengan nilai batas bawah -2,992 dan nilai batas atas -2,215. Hasil uji *Mann-whitney* pada data ekspresi gen TRP1 menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit petai yang dapat menurunkan ekspresi gen TRP1 pada tikus jantan galur wistar model hiperpigmentasi.

## 5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan radiasi UVB merupakan faktor risiko utama hiperpigmentasi kulit, yang ditandai dengan peningkatan ekspresi enzyme pembentuk melanin seperti tyrosinase, TRP1, dan TRP1.<sup>47,53</sup> Radiasi UVB terbukti meningkatkan stress oksidatif akibat kerusakan DNA sehingga dapat mengaktifasi jalur pembentukan melanin seperti jalur *nuclear factor kappa beta* (NF-kB) dan jalur *melanocyte inducing transcription factor* (MITF).<sup>25,59</sup> Dalam proses melanogenesis, tirosinase berperan dalam mengubah *L-tyrosine* menjadi *L-3,4-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA).<sup>60</sup> L-DOPA kemudian dioksidasi menjadi *L-DOPAquinone*, yang kemudian membentuk eumelanin dan pheomelanin<sup>61</sup> Sehingga menimbulkan warna kehitaman pada kulit. Penelitian terbaru menegaskan bahwa ekstrak kulit buah petai yang mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, dan saponin dapat menekan pembentukan ROS karena aktivitas antioksidannya.<sup>18,41,62</sup>

Kemampuan ekstrak untuk menekan ROS berpotensi mencegah produksi melanin.<sup>20</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak kulit petai terhadap ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 pada model hiperpigmentasi tikus. Hewan uji dipaparkan radiasi UVB pada 302 nm dengan intensitas energi 390mJ/cm<sup>2</sup> sebanyak tiga kali seminggu selama dua minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif terjadi peningkatan jumlah melanin pada tikus hingga 46,5%. Pada pemberian gel ekstrak kulit petai terbukti menurunkan ekspresi gen tyrosinase dan TRP1 pada kelompok K3 (gel ekstrak kulit buah petai 10%) dan K4 (gel ekstrak kulit buah petai 20%) secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol hiperpigmentasi (kontrol negatif). Hal ini menunjukkan bahwa gel ekstrak kulit petai dapat mencegah hiperpigmentasi melalui mekanisme menurunkan ekspresi gen tyrosinase dan TRP1.

Senyawa metabolit sekunder yang berasal dari ekstrak kulit buah petai seperti flavonoid, fenolik, saponin, tannin dan terpenoid diduga dapat menghambat menghambat aktivitas MITF melalui penghambatan jalur PI3K/Akt.<sup>4,25,33</sup> Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat TGF- $\beta$  melalui jalur cAMP/protein kinase A dan menginduksi GLI2, kemudian menekan MITF, faktor transkripsi sentral dalam melanogenesis.<sup>63</sup> MITF yang terhambat akan mencegah sintesis enzyme tyrosinase, sehingga L-tyrosine tidak dapat dirubah menjadi L-DOPA. Penurunan kadar L-DOPA juga dilaporkan menurunkan ekspresi TRP1 dan TRP2.<sup>52</sup>

Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak seperti flavonoid dan senyawa fenolik dilaporkan menghambat TGF- $\beta$  sehingga menekan melanogenesis dengan memberi sinyal melalui reseptor heteromerik ligan spesifik, yaitu reseptor serin/treonin kinase yang memfosforilasi dan mengaktifkan reseptor (R)-Smad. Hal ini mengarah pada pembentukan kompleks dengan (Co)-Smad, Smad4, dan regulasi transkripsi gen target, yang pada akhirnya menekan ekspresi enzyme pengatur melanogenesis seperti tyrosinase, TRP1, dan TRP2.<sup>4,47</sup>

Ekstrak kulit petai menghambat tyrosinase, akibatnya menghambat aktivitas TRP1 dan TRP2 yang berkorelasi dengan jalur pembentukan eumelanin dan pheomelanin. Penekanan ekspresi TRP1 yang berlebihan dapat menghambat sintesis melanin. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa peningkatan ekspresi TRP1 berkorelasi dengan peningkatan melanin akibat penyinaran UVB.<sup>47,64</sup> Namun, peningkatan ekspresi TRP2 dikaitkan dengan proliferasi sel melanoma. Dalam penelitian ini, penerapan gel ekstrak kulit buah petai secara signifikan dan tergantung dosis mencegah hiperpigmentasi. Hal ini menunjukkan bahwa aplikasi gel ekstrak kulit petai menurunkan ekspresi gene tyrosinase dan TRP1, sehingga mencegah pembentukan melanin dalam sel melanosit.

Keterbatasan penelitian ini adalah kurangnya pemeriksaan kadar ROS dan MITF setelah pengaplikasian gel ekstrak kulit buah petai, sehingga mekanisme molekuler langsung ekstrak mengenai pencegahan produksi melanin masih belum diketahui.

## 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 tyrosinase 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 ekspresi gen TRP1 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 pemeriksaan lebih lanjut tentang pengukuran kadar MITF setelah dilakukan pemberian gel ekstrak kulit petai pada tikus galur *Wistar* model hiperpigmentasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- 1 Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C *et al.* Changes of MMP-1 and collagen type I $\alpha$ 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 633–637.
- 2 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.
- 3 Niu C, Aisa HA. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules* 2017; **22**. doi:10.3390/molecules22081303.
- 4 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.
- 5 Xue L, Li Y, Zhao B, Chen T, Dong Y, Fan R *et al.* TRP-2 mediates coat color pigmentation in sheep skin. *Mol Med Rep* 2018; **17**: 5869–5877.
- 6 Hada M, Mondul AM, Weinstein SJ, Albanes D. Serum retinol and risk of overall and site-specific cancer in the ATBC study. *Am J Epidemiol* 2020; **189**: 532–542.
- 7 Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
- 8 Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**: 1–14.
- 9 Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Ebell M, Epling JW *et al.* Screening for skin cancer US preventive services task force



- recommendation statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2016; **316**: 429–435.
- 10 Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2009; **4**: 551–579.
- 11 Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients* 2016; **8**: 8–11.
- 12 Andy S, Najatullah, Nugroho Trilaksana, Neni Susilaningih. The Effect of Ethanolic Extract from Moringa oleifera Leaves in Collagen Density and Numbers of New Capillary Vessel Count on Wistar Rats Burn Wound. *Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research* 2022; **6**: 1936–1941.
- 13 Siow HL, Gan CY. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from Parkia speciosa seeds. *Food Chem* 2013; **141**: 3435–3442.
- 14 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.
- 15 Tuerxuntayi A, Liu Y qiang, Tulake A, Kabas M, Eblimit A, Aisa HA. Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells. *BMC Complement Altern Med* 2014; **14**: 1–9.
- 16 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.

- 17 Mustafa NH, Ugusman A, Jalil J, Kamisah Y. Anti-inflammatory property of *Parkia speciosa* empty pod extract in human umbilical vein endothelial cells. *J Appl Pharm Sci* 2018; **8**: 152–158.
- 18 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.
- 19 Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *et al.* Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci* 2022; **10**: 1–7.
- 20 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.
- 21 Freyhaus H Ten, Dagnell M, Leuchs M, Vantler M, Berghausen EM, Caglayan E *et al.* Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *Am J Respir Crit Care Med* 2011. doi:10.1164/rccm.200911-1663OC.
- 22 Padhi S, Sarangi RL, Ramdas A, Ravichandran K, Varghese RGB, Alexander T *et al.* Cutaneous hyperpigmentation in megaloblastic anemia: A five year retrospective review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; **8**. doi:10.4084/MJHID.2016.021.
- 23 Rong J, Shan C, Liu S, Zheng H, Liu C, Liu M *et al.* Skin resistance to UVB-induced oxidative stress and hyperpigmentation by the topical use of

- Lactobacillus helveticus NS8-fermented milk supernatant. *J Appl Microbiol* 2017; **123**: 511–523.
- 24 Li L, Ngo HTT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J *et al*. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21010049.
- 25 Alam MB, Bajpai VK, Lee JI, Zhao P, Byeon JH, Ra JS *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**: 1–12.
- 26 Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg Med Chem* 2005; **13**: 433–441.
- 27 Oh TI, Yun JM, Park EJ, Kim YS, Lee YM, Lim JH. Plumbagin suppresses  $\alpha$ -MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. *Int J Mol Sci* 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18020320.
- 28 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
- 29 Lin MH, Hung CF, Sung HC, Yang SC, Yu HP, Fang JY. The bioactivities of resveratrol and its naturally occurring derivatives on skin. *J Food Drug Anal* 2021; **29**: 15–38.
- 30 Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important

- for Melanogenesis. *Angewandte Chemie - International Edition* 2017; **56**: 9812–9815.
- 31 Milac AL, Negroiu G. The Multiple Roles of Tyrosinase-Related Protein-2/L- Dopachrome Tautomerase in Melanoma: Biomarker, Therapeutic Target, and Molecular Driver in Tumor Progression. *Human Skin Cancers - Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments* 2018. doi:10.5772/intechopen.70513.
- 32 Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol* 2018; **98**: 924–931.
- 33 Villareal MO, Kume S, Neffati M, Isoda H. Upregulation of Mitf by Phenolic Compounds-Rich *Cymbopogon schoenanthus* Treatment Promotes Melanogenesis in B16 Melanoma Cells and Human Epidermal Melanocytes. *Biomed Res Int* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8303671.
- 34 Maddaleno AS, Camargo J, Mitjans M, Vinardell MP. cosmetics Melanogenesis and Melasma Treatment. 2021. doi:10.3390/cosmetics.
- 35 Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol* 2019; **28**: 23–27.
- 36 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 1–11.
- 37 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association* 2008; **20**.
- 38 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci* 2008; **30**: 87–95.

- 39 Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res* 2011; **27**: 1.
- 40 Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol* 2011; **131**. doi:10.1038/skinbio.2011.4.
- 41 Kamisah Y, Othman F, Qodriyah HMS, Jaarin K. *Parkia speciosa* Hassk.: A potential phytomedicine. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2013; **2013**. doi:10.1155/2013/709028.
- 42 Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev.* 2015. doi:10.1016/j.arr.2015.01.001.
- 43 Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y *et al.* Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- $\beta$ /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.
- 44 Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- $\beta$ 1 from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* 2007; **179**: 1311–1323.
- 45 Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients* 2018. doi:10.3390/nu10040495.
- 46 Ramli S, Ruangrunsi N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. 2021.
- 47 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.
- 48 Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Mol Cancer* 2020; **19**: 1–12.
- 49 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 50 Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; **36**: 1482–1491.
- 51 Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1196–1202.
- 52 Slominski A. L-tyrosine and L-DOPA as hormone-like regulators of melanocytes functions. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **72**: 181–204.
- 53 Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T *et al.* Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO Journal* 1994; **13**: 5818–5825.
- 54 Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2009; **64**: 303–311.



- 55 Imamsari M, Keontjoro MP, Nurhayati AP, Isiantoni, Prasetyo EN. IN-VIVO PRELIMINARY EXAMINATION OF MORINGA OLEIFERA LEAVES EXTRACT AS ANTIAGING CANDIDATE IN SWISS WEBSTER MALE MICE (MUS MUSCULUS). *Int J Pharm Sci Res* 2018; **9**: 3638–3646.
- 56 Yong-Bing X, Gui-Lin C, Ming-Quan G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of moringa oleifera from kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants* 2019; **8**. doi:10.3390/antiox8080296.
- 57 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.
- 58 Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, Miller KJ, Ehanire T, Quiles C *et al*. A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair and Regeneration* 2014; **22**: 755–764.
- 59 Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 406–414.
- 60 Hori I, Nihei K, Kubo I. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytotherapy Research* 2004; **18**: 475–479.
- 61 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.
- 62 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.

- 63 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- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 17996–18004.
- 64 Park JS, Kim DH, Lee JK, Lee JY, Kim DH, Kim HK *et al.* Natural ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from aged Korean fermented soybean paste as potent tyrosinase and melanin formation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; **20**: 1162–1164.

