

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SAWO
(*MANILKARA ZAPOTA L.P ROYEN*) TERHADAP EKSPRESI
IL-1 DAN TNF- α PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR
WISTAR YANG DIINDUKSI DENGAN SINAR UV B**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

Dina Utari Almi

MBK 2219010278

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2024**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SAWO
(*MANILKARA ZAPOTA L.P ROYEN*) TERHADAP EKSPRESI
IL-1 DAN TNF- α PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR
WISTAR YANG DIINDUKSI DENGAN SINAR UV B**

Disusun oleh

Dina Utari Almi

MBK 2219010278

Menyetujui.

Pembimbing 1

Pembimbing 2


Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes.

NIK. 210101059



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF

NIK. 210199049

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


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

NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini 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.

Semarang, Januari 2024

Yang menyatakan



Dina Utari Almi



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil Alamin, puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunia-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sawo (*Manilkara zapota L.P Royen*) Terhadap Ekspresi IL-1 dan TNF- α Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Dengan Sinar UV B.

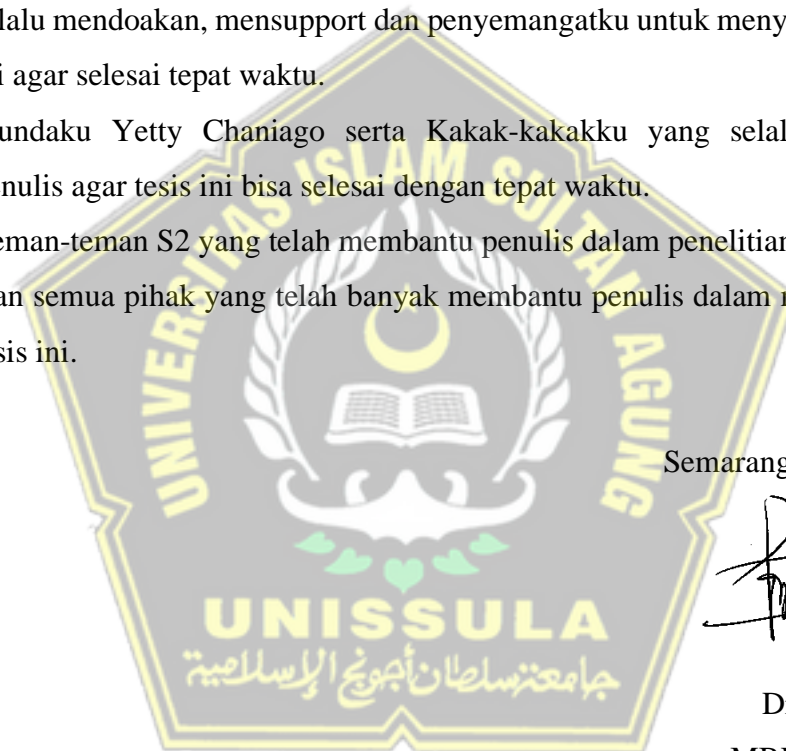
Tesis ditulis dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M. Biomed) di Sekolah Pascasarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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 terimakasih yang setulus-tulusnya penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H. Sp. KF selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Biomedik.
3. Prof. Dr. dr H. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan kesempatan penulis untuk mengikuti pendidikan di Prodi Biomedik.

4. Tim pembimbing: Dr. dr Hadi Sarosa, M. Kes dan Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.KF yang telah membimbing dengan segenap ilmu, waktu, tenaga dalam menyusun tesis ini.
5. Tim penguji: Dr. dr Chodidjah, M. Kes, Dr. Dra Atina Husaana, M. Si, Apt, dan Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes yang telah bersedia menilai dan memberi masukan kepada penulis.
6. Segenap dosen Ilmu Biomedik Konsentrasi *Aesthetic Medicine*
7. Suamiku dr Ahmad Ripal dan anak-anakku Labib, Latisha, dan Lavsha yang selalu mendoakan, mensupport dan penyemangatku untuk menyelesaikan tesis ini agar selesai tepat waktu.
8. Ibundaku Yetty Chaniago serta Kakak-kakakku yang selalu mendoakan penulis agar tesis ini bisa selesai dengan tepat waktu.
9. Teman-teman S2 yang telah membantu penulis dalam penelitian ini.
10. Dan semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.



Semarang, Januari 2024

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dina Utari Almi', is written over a white background.

Dina Utari Almi
MBK 2219010278

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
TESIS	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Originalitas Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	9
1.5.1 Manfaat teoritis.....	9
1.5.2 Manfaat Praktis.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10

2.1 Dermatoheliosis (Sunburn)	10
2.1.1 Definisi Dermatoheliosis	10
2.1.2 Epidemiologi Dermatoheliosis	11
2.1.3 Patogenesis Dermatoheliosis	13
2.1.4 Diagnosis Dermatoheliosis	16
2.2 Histologi Kulit.....	17
2.3 IL-1 pada Kulit	20
2.4 TNF- α pada Kulit	21
2.5 Daun Sawo (Manilkara zapota).....	22
2.5.1 Klasifikasi Manilkara zapota	22
2.5.2 Ekstrak Daun Manilkara zapota.....	22
2.6 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Manilkara zapota Terhadap IL 1 dan TNF- α Pada Tikus Wistar Yang Diinduksi UV	23
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	26
3.1 Kerangka Teori.....	26
3.2 Kerangka Konsep	29
3.3 Hipotesis Penelitian.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	30
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	31
4.2.1 Populasi	31
4.2.2 Sampel	32
4.2.3 Teknik Sampling.....	33
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
4.3.1 Variabel Penelitian.....	34

4.3.2 Definisi Operasional.....	34
4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian.....	35
4.4.1 Bahan Penelitian	35
4.4.2 Instrumen Penelitian	35
4.5 Alur Penelitian.....	36
4.5.1 Perolehan Ethical Clearance	36
4.5.2 Pembuatan Krim Ekstrak Daun Manilkara zapota	36
4.5.3 Perlakuan pada Hewan Coba.....	37
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	38
4.6.1 Tempat Penelitian	38
4.6.2 Waktu Penelitian	38
4.7 Alur Penelitian.....	39
4.8 Analisis Data	40
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	41
5.1 Hasil Penelitian.....	41
5.1.1 Kandungan flavonoid dan fenol ekstrak daun sawo (Manilkara zapota) dan hasil validasi pewarnaan HE pada tikus yang dipapar UV-B	42
5.1.2 Analisis ekspresi IL-1 pada tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo	43
5.1.3 Analisis ekspresi TNF- α pada tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo	45
4.2. Pembahasan	47
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	53
6.1. Kesimpulan.....	53
6.2. Saran.....	53

DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	58
1. Lampiran uji statistik.....	58
2. Lampiran hasil analisis kadar flavonoid dan total pheno	61
3. Hasil analisis ELISA	62
4. Dokumentasi penelitian.....	64



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Tabel originalitas penelitian.....	5
Tabel 2.1 Anggota keluarga IL-1	21
Tabel 5.1 Hasil uji deskriptif ekspresi IL-1 dan uji <i>One way anova</i> tiap kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo.	43
Tabel 5. 2 Hasil uji deskriptif ekspresi TNF- α dan uji <i>One way anova</i> tiap kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo.....	45
Tabel 5.3 Hasil uji <i>Pos Hoc LSD</i> Ekspresi TNF- α tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Mekanisme <i>dermatoheliosis</i>	11
Gambar 2. 2 Klasifikasi UVI berdasarkan WHO, 2022.....	12
Gambar 2. 3 Efek kerusakan utama dari radiasi UV.....	13
Gambar 2. 4 Jalur inflamasi persinyalan yang diinduksi UVR.....	15
Gambar 2. 5 Efek immunosupresif dari radiasi UV.....	16
Gambar 2.6 Manifestasi klinis photoaging	17
Gambar 2.7 Lapisan epidermis dan dermis pada kulit.....	18
Gambar 2.8 Melanosit pada stratum basalis	19
Gambar 2.9 Lapisan dermis terdiri dari serat-serat elastis.....	19
Gambar 2.10 Diagram skematik sitokin proinflamasi	25
Gambar 3.1 Kerangka teori.....	28
Gambar 3.2 Kerangka konsep.....	29
Gambar 4.1 Alur Kerja.....	39
Gambar 5.1 Hasil pewarnaan HE kelompok kontrol pada pembesaran 40x.....	42
Gambar 5.2 Hasil pewarnaan HE tikus yang dipapar UV-B pada kelompok perlakuan pada pembesaran 40x.	43
Gambar 5.3 Grafik rata-rata ekspresi IL-1 antar kelompok tikus yang dipapar UV- B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo.....	44
Gambar 5.4 Rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo	46

DAFTAR SINGKATAN

UV : *Ultraviolet*

UVA : *Ultraviolet A*

UVB : *Ultraviolet B*

UVC : *Ultraviolet C*

UVR : *Ultraviolet Radiasi*

UVI : *Ultraviolet Index*

IL-1 : *Interleukin 1*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alfa*

ROS : *Reactive Oxygen Spesies*

NF-kB : *Nuclear Factor Kappa B*

FST : *Fitzpatrick*

TLR : *Toll Like Reseptor*

TIR : *Toll IL-1 Reseptor*

DAMP : *Damage-Associated Molecular Patterns*

WHO : *World Health Organization*

DNA : *Deoxy Nucleat*



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan UVB berlebihan menimbulkan masalah kesehatan pada manusia, efeknya pada kulit yaitu perubahan molekuler dan seluler. *Sunburn* adalah efek klinis akut yang paling jelas, mengakibatkan produksi TNF- α oleh keratinosit, IL-1 merupakan sitokin yang berpengaruh terhadap TNF- α . Luka kulit melepaskan berbagai *damage associated molecular patterns* (DAMPs) akan mengaktifkan jalur pensinyalan inflamasi seperti NLRP3 inflammasom dan *toll-like receptor* (TLRs) yang menyebabkan peningkatan produksi sitokin inflamasi. Tujuan dari Penelitian ini untuk melihat efek antiinflamasi dari ekstrak daun *Manilkara zapota* yang dinilai berdasarkan ekspresi IL-1 dan TNF- α pada tikus wistar yang papar UVB.

Metode: Penelitian eksperimental *post-test only control group design* yang menggunakan objek penelitian tikus (*Rattus norvegicus*), dibagi 4 kelompok yaitu (K1) tikus kontrol tanpa perlakuan, (K2) tikus dipapar sinar UVB kemudian diberikan krim placebo, (K3) kelompok tikus dipapar sinar UVB kemudian diberikan krim ekstrak daun sawo 25%, dan (K4) tikus dipapar sinar UVB kemudian diberikan krim ekstrak daun sawo 50%.

Hasil Penelitian: Rata-rata ekspresi IL-1 dengan Uji *One-Way ANOVA* diperoleh hasil 0,197 ($p < 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata ekspresi IL-1 yang bermakna antar kelompok. Sedangkan rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok diperoleh hasil 0,036 ($p < 0,05$), hasil menunjukkan adanya perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α yang bermakna antar kelompok, ekspresi TNF- α dengan uji *Post Hoc LSD* krim ekstrak daun sawo dosis 50% (K4) menurunkan ekspresi TNF- α lebih rendah dibandingkan K1 maupun K2.

Kesimpulan: Pemberian krim ekstrak daun (*Manilkara zapota*) berpengaruh terhadap ekspresi TNF- α , namun tidak mempengaruhi ekspresi IL-1 pada model tikus yang mengalami *sunburn*.

Kata Kunci: *sunburn*, krim *Manilkara zapota*, IL-6, TNF- α

ABSTRACT

Background: Excessive UVB exposure causes health problems in humans, the effect on the skin is molecular and cellular changes. Sunburn is the most obvious acute clinical effect, resulting in the production of TNF- α by keratinocytes, IL-1 is a cytokine that influences TNF- α . Skin wounds release various damage associated molecular patterns (DAMPs) which will activate inflammatory signaling pathways such as NLRP3 inflammasomes and toll-like receptors (TLRs) which cause increased production of inflammatory cytokines. The aim of this study was to examine the anti-inflammatory effect of *Manilkara zapota* leaf extract which was assessed based on the expression of IL-1 and TNF- α in Wistar rats exposed to UVB.

Method: Post-test only control group design experimental research using rats (*Rattus norvegicus*) as research objects, divided into 4 groups, namely (K1) control rats without treatment, (K2) rats exposed to UVB light then given placebo cream, (K3) rat group exposed to UVB light then given 25% sapodilla leaf extract cream, and (K4) mice were exposed to UVB light then given 50% sapodilla leaf extract cream.

Results: The average expression of IL-1 using the One-Way ANOVA test was 0.197 ($p < 0.05$), which means there was no significant difference in the average expression of IL-1 between groups. Meanwhile, the average TNF- α expression between groups was 0.036 ($p < 0.05$), the results showed that there was a significant difference in the average TNF- α expression between groups, TNF- α expression using the Post Hoc LSD test of sapodilla leaf extract cream 50% dose (K4) reduced TNF- α expression to a lesser extent than K1 or K2.

Conclusion: Administration of leaf extract cream (*Manilkara zapota*) affected the expression of TNF- α , but did not affect the expression of IL-1 in a mouse model experiencing sunburn.

Keywords: sunburn, *Manilkara zapota* cream, IL-6, TNF- α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paparan radiasi matahari yang berlebihan dapat menimbulkan masalah kesehatan pada manusia. Radiasi matahari memiliki banyak efek pada kesehatan manusia, yang semuanya didukung oleh perubahan molekuler (misalnya, kerusakan DNA) dan seluler (misalnya, *Langerhans* dan migrasi sel dendritik dermal).¹ *Sunburn* (eritema) adalah efek klinis akut yang paling jelas dan kanker kulit adalah efek kronis yang paling umum terjadi. *World Health Organization* (WHO), diperkirakan sekitar 11 juta orang setiap tahun mengalami *sunburn*.²

Penyembuhan luka *sunburn* merupakan proses yang kompleks yang terdiri dari infiltrasi sel inflamasi, proliferasi sel, dan fase *remodeling* jaringan untuk mengembalikan integritas dan fungsi kulit. Paparan ultraviolet B mengakibatkan produksi TNF- α oleh keratinosit. TNF- α berperan penting dalam kaskade inflamasi. Interleukin-1 (IL-1) merupakan sitokin yang berpengaruh terhadap TNF- α . Luka kulit melepaskan berbagai *damage associated molecular patterns* (DAMPs) akan mengaktifkan jalur pensinyalan inflamasi seperti NLRP3 inflammasom dan *toll-like receptor* (TLRs) yang menyebabkan peningkatan produksi sitokin inflamasi.³

Ekstrak daun sawo (*M. Zapota*) memiliki kandungan flavonoid yang sangat signifikan diketahui memiliki efek antiinflamasi. Manfaat kesehatan

dari sawo telah dilaporkan yaitu, daunnya dapat menunjukkan aktivitas antiinflamasi dan antipiretik. Data sebelumnya menunjukkan fungsi antioksidan *Manilkara zapota* dari polifenol, terutama gallocatechin atau catechin, dan juga polifenol neo-bioaktif dengan metil 4-O-galloylchlorogenate dan asam 4-O-galloylchlorogenic dalam *Manilkara zapota* yang diekstrak metanol. Fitokonstituen seperti flavonoid, saponin, tanin, glikosida yang ditunjukkan oleh skrining fitokimia dalam ekstrak kasar daun *M. Zapota* mempunyai efek antiinflamasi. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antiinflamasi dapat melalui beberapa jalur dengan menghambat aktivitas siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrophil, dan penghambatan histamin. *M. Zapota* memiliki efek dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase secara signifikan dalam konsentrasi yang rendah ($IC_{50} 2.51 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$).⁴

Ekstrak *crude methanol* daun *M. Zapota* diketahui memiliki aktivitas antioksidan $3.523 \pm 0.382 \text{ mmol trolox equivalent/gram}$. Analisis fotokimia memperlihatkan *M. Zapota* memiliki kandungan flavonoid, steroid, glikosida, antrakuinon, antron, kumarin, fenol, dan tanin. Fenol yang diekstraksi dari tumbuhan merupakan antioksidan yang dapat melakukan terminasi radikal bebas.⁵ Daun *M. Zapota* diketahui memiliki efek antioksidan, antimikroba, anti-inflamasi, anti-tumor, *anti-cancer*, antipiretik, anti-diare, anti-nosiseptif, dan kemampuan untuk menurunkan kadar asam urat. Berdasarkan analisis yang dilakukan, daun *M. Zapota*

memiliki kapasitas fenol total, kapasitas flavonoid, dan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian tumbuhan yang lainnya. Hal ini dapat dikarenakan paparan ultraviolet yang tinggi pada daun. Proporsi flavonoid yang lebih tinggi ditemukan pada daun yang berada di wilayah tropis dibandingkan kondisi dingin akibat tingginya radiasi UV yang didapatkan.⁶

Saat ini, penelitian mengenai efek daun *M. Zapota* masih terbatas. Penelitian *in vivo* serta *in vitro* telah dilakukan pada ekstrak daun ini. Penelitian terbaru menelaah efek kulit batang *M. Zapota* ini secara *in vivo* pada tikus wistar. Pada penelitian tersebut terdapat peningkatan jaringan epitel, proliferasi kolagen, dan keratinisasi pada aktivitas penyembuhan luka di hewan percobaan yang diberikan *M. Zapota*.⁷

Tujuan dari pengobatan luka *sunburn* adalah penyembuhan luka yang cepat untuk mencegah infeksi dan meminimalisir komplikasi. Meski begitu masih belum ada penelitian yang meneliti pengaruh pemberian ekstrak daun *Manilkara zapota* terhadap proses penyembuhan kulit pada luka bakar. Penelitian ini akan dilakukan evaluasi terhadap efek antiinflamasi dari ekstrak daun *Manilkara zapota* yang dinilai berdasarkan ekspresi IL-1 dan TNF- α pada tikus wistar yang diinduksi UVB

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun *Manilkara zapota* terhadap ekspresi IL-1 dan TNF- α kulit tikus wistar yang diinduksi UVB?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) terhadap ekspresi IL-1 dan TNF- α kulit tikus wistar yang diinduksi UVB.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) terhadap ekspresi IL-1 pada tikus wistar kelompok kontrol dan perlakuan.

1.3.2.2 Mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) terhadap ekspresi TNF- α pada tikus wistar kelompok kontrol dan perlakuan.

1.4 Originalitas Penelitian

Sejauh ini, penelitian tentang Pengaruh pemberian ekstrak daun *Manilkara zapota* terhadap IL-1 dan TNF- α pada tikus wistar yang diinduksi UV masih terbatas. Adapun penelitian yang terkait dengan penelitian ini adalah:

Tabel 1.1 Tabel originalitas penelitian

Peneliti	Judul penelitian	Metode	Hasil
Ganguly et al. 2013	In-vivo anti-inflammatory and anti-pyretic activities of <i>Manilkara zapota</i> leaves in albino Wistar rats	Aktivitas anti-inflamasi dievaluasi dengan metode edema kaki yang diinduksi karagenan; potensi anti-piretik ditentukan dengan metode pireksia yang diinduksi ragi pada tikus albino Wistar.	Temuan penelitian menunjukkan aktivitas antiinflamasi dan antipiretik daun <i>Manilkara zapota</i> yang bisa menjadi pilihan terapi melawan penyakit inflamasi dan demam.
Chanda et al.	Antioxidant Capacity of <i>Manilkara zapota</i> L. Leaves Extracts Evaluated by Four in vitro Methods	Kapasitas antioksidan dari ekstrak daun <i>Manilkara zapota</i> L., diperoleh dengan ekstraksi sekuensial dengan polaritas pelarut yang berbeda, dievaluasi dengan empat metode in vitro yang berbeda: 2, 2-diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH), Aktivitas pembersihan radikal superoksida, aktivitas penghilangan radikal hidroksil dan uji penilaian penurunan kapasitas.	Dalam karya ini, kapasitas antioksidan tinggi yang diamati untuk ekstrak aseton daun <i>M. zapota</i> menunjukkan bahwa ia mungkin berperan dalam mencegah penyakit manusia yang melibatkan radikal bebas, seperti kanker, penuaan, dan penyakit kardiovaskular.
Yajing Hu, et al. 2010	The Role of Interleukin-1 in Wound Biology. Part II: In Vivo and Human Translational Studies	Model luka insisi digunakan untuk menilai peran in vivo IL-1 dalam biologi luka. 7 sitokin / kemokin berbeda yang dihasilkan dalam sayatan kulit yang diinduksi secara eksperimental pada	Pemberian antagonis reseptor IL-1 pada tikus menurunkan respon nosiseptif terhadap luka insisi, dan mengurangi produksi beberapa mediator inflamasi, termasuk <i>keratinocyte-derived</i>

kaki tikus dan respons nosiseptif dianalisis pada tikus yang diobati dengan penghambat IL-1.

chemokine (KC) dan *macrophage inhibitor protein* (MIP)-1 α . IL-1 merangsang produksi keratinosit manusia primer secara in vitro.

Meena R, et al 2020	Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice	Tikus betina diobati dengan etanercept (TNF blocker, 4 mg/kg/hr) selama 4 hari 1 jam sebelum iradiasi UVB. Pada hari kelima tikus dikorbankan 3 jam setelah paparan UVB. Memblokir TNF α menghambat makrofag, sel mast, dan neutrophil yang diinduksi UVB. Kulit tikus yang disinari UVB mengandung kolagen yang lebih matang dibandingkan mencit yang diterapi dengan etanercept dan UVB+ etanercept	Iradiasi UV menginduksi sitokin proinflamasi seperti produksi TNF- α dan IL1 oleh keratinosit, fibroblast dermal dan sel inflamasi lainnya. TNF- α merangsang pelepasan banyak sitokin dan kemokin.
Ramos A, et al 2022	Antioxidant and Anticancer Activities of Manilkara zapota and Lansium domesticum Leaves Coupled with Metabolomics analysis using Molecular Networking.	Daun <i>M. zapota</i> dikeringkan selama 3 hari dan kemudian diekstrak menggunakan heksan, etil asetat, dan methanol. Bagian dari ekstrak daun kemudian melalui prosedur pembersihan yaitu ekstraksi <i>solid-phase</i> menggunakan resin poliamida untuk menghilangkan tannin dan ekstraksi cairan-cairan menggunakan	Ekstrak daun <i>M. Zapota</i> diketahui memiliki aktivitas antioksidan 3.523 \pm 0.382 mmol <i>trolox equivalent/gram</i> . Terdapat pengurangan aktivitas antioksidan dan antikanker pada ekstrak. Analisis fotokimia memperlihatkan <i>M. Zapota</i> memiliki kandungan flavonoid, steroid, glikosida,

		heksan untuk menghilangkan klorofil. Selanjutnya ekstrak daun diskriming untuk melihat aktivitas antioksidan dan antikanker.	antrakuinon, antron, kumarin, fenol, dan tanin. Fenol yang diekstraksi dari tumbuhan merupakan antioksidan yang dapat melakukan terminasi radikal bebas.
Mohd Tamsir N, et al 2020	Manilkara zapota (L.) P. Royen: Potential source of natural antioxidants.	Evaluasi antioksidan <i>in vitro</i> seperti <i>content of total phenolic (TPC)</i> , <i>total flavonoids (TFC)</i> , dan aktivitas <i>scavenging DPPH</i> dari daun, benih, buah, dan kulit <i>M. zapota</i> . Identifikasi fotokonstituen menggunakan cairan kromatografi <i>mass spectrometry</i> dilakukan pada komponen dengan poin tertinggi dalam hal evaluasi <i>in vitro</i> .	Daun <i>M. Zapota</i> memiliki kapasitas fenol total, kapasitas flavonoid, dan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian tumbuhan yang lainnya. Hal ini dapat dikarenakan paparan ultraviolet yang tinggi pada daun. Proporsi flavonoid yang lebih tinggi ditemukan pada daun yang berada di wilayah tropis dibandingkan kondisi dingin akibat tingginya radiasi UV yang didapatkan
Kiranmayi GVN, et al 2022	<i>Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Manilkara zapota L. (Chiku) Leaves by Sequential Soxhlet Extraction Method</i>	Aktivitas antioksidan <i>in vitro</i> dievaluasi menggunakan parameter radikal bebas aktivitas <i>scavenging AS</i> menggunakan radikal hidrosil <i>assay</i> , fosfor molibdenum antioksidan <i>assay</i> , aktivitas <i>scavenging NO</i> , dan H_2O_2 <i>scavenging assay</i> . Tes renang paksa, tes	Nilai IC_{50} hidrogen peroksida dan hidrosil <i>scavenging</i> radikal ditemukan sebesar 24,5 dan 81,28 ug/ml untuk ekstrak dan 7,94 dan 40,7 ug/ml untuk AA. Ekstrak daun menunjukkan penurunan imobilitas yang signifikan ($P < 0,01$) pada suspensi ekor dan model depresi

		<p>suspensi ekor dan aktivitas lokomotor menggunakan fotoaktometer digital untuk menyelidiki aktivitas antidepresan. AA, fluoksetin (10 mg/kg) dan imipramin (4 mg/kg, po) dijadikan sebagai pembanding</p>	<p>berenang paksa, sebanding dengan imipramin.</p>
<p>Konuku K, et al 2017</p>	<p><i>Anti-inflammatory Activity of Manilkara zapota Leaf Extract</i></p>	<p>Uji in vitro fosfolipase A2 (PLA2) dan 5-lipoksigenase (5-LOX) dan penelitian in vivo menggunakan karagenan yang menginduksi model edema pada kaki tikus untuk menilai aktivitas antiinflamasi ekstrak daun <i>M. zapota</i></p>	<p>Penelitian in vitro menunjukkan bahwa ekstrak daun <i>M. zapota</i> dapat menghambat aktivitas SPLA2 dan 5-LOX secara signifikan. Studi in vivo menunjukkan penghambatan dapat terjadi tergantung dosis pada edema kaki tikus yang diinduksi karagenan. Aktivitas antiinflamasi daun ekstrak etil asetat lebih unggul dari ekstrak metanol.</p>
<p>Putson P, et al 2023</p>	<p><i>Biological activity of dried infused sapodilla (Manilkara zapota) leaf tea formulated with different milk and sugar contents</i></p>	<p>Daun <i>M. zapota</i> kering direndam dengan air panas 1 g/120 mL (kadar rendah) dan 1 g/68 mL (kadar tinggi) dan diformulasi dengan susu almond, susu kedelai, susu sapi bebas lemak, dan susu sapi bebas laktosa. Setiap formulasi ditentukan melalui warna, kandungan total fenolik, dan aktivitas antioksidan total menggunakan uji</p>	<p>Prototipe memiliki perkiraan GI lebih rendah dibandingkan produk komersial ($p < 0,05$) dan skor kesukaan keseluruhan yang tinggi sebesar 7,6 ($n=30$). Aktivitas antioksidan dari teh daun <i>M. Zapota</i> bertambah dan terstabilisasi dengan menambahkan susu atau air. <i>M. Zapota</i> dapat berhasil</p>

ABTS dan FRAP. Dua pemanis, gula putih dan gula <i>smart-branded</i> , ditambahkan dan diuji kapasitas antioksidan dan penerimaan sensoriknya.	dimasukkan ke dalam makanan.
--	------------------------------

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *Manilkara zapota* terhadap penurunan kadar IL-1 dan TNF- α pada epidermis tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang dipapar radiasi Ultraviolet-B. Hasil penelitian dapat menjadi bahan pertimbangan ataupun referensi untuk penelitian selanjutnya.

1.5.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang ekstrak etanol daun *Manilkara zapota* yang dapat memberikan perlindungan terhadap kulit dari pengaruh kerusakan akibat sinar UV-B sehingga ekstrak etanol daun *Manilkara zapota* dapat dimanfaatkan untuk mencegah penuaan dini.

BAB II

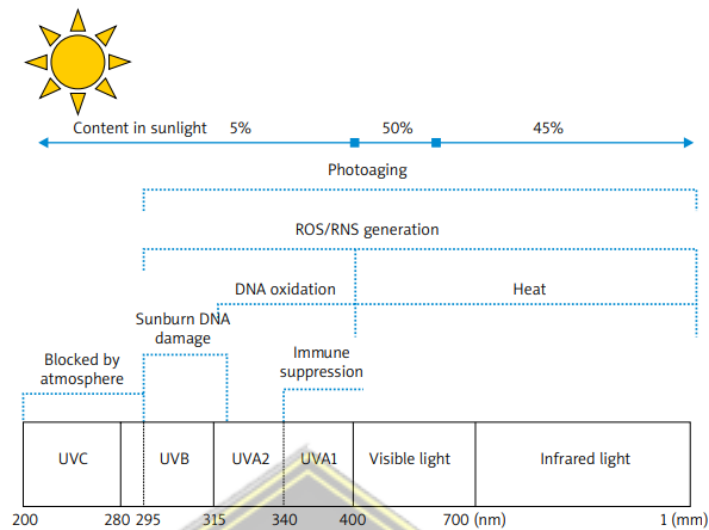
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Dermatoheliosis (*Sunburn*)

2.1.1 Definisi *Dermatoheliosis*

Dermatoheliosis adalah suatu kondisi yang berkaitan dengan akumulasi paparan sinar matahari.⁸ *Dermatoheliosis*, juga dikenal sebagai *photo aging*, adalah hasil dari paparan berulang terhadap sinar UVA dan UVB dari matahari. Paparan sinar matahari yang berulang dan sering tanpa tabir surya atau tabir surya yang tidak tepat dapat menyebabkan kulit yang rusak atau tampak tua.

UVB hanya menghasilkan 5% dari radiasi UV yang mencapai permukaan bumi dan memiliki sedikit penetrasi, tetapi menunjukkan aktivitas biologi yang hebat. UVA menghasilkan 95% dari radiasi UV yang mencapai bumi dan dapat lebih menembus ke lapisan kulit lebih dalam. Meskipun relatif sedikit mencapai permukaan bumi, radiasi UVB memiliki lebih banyak energi daripada UVA, dan diperkirakan UVB 1000 kali lebih eritematogenik daripada UVA. Jadi meskipun lebih banyak UVA yang mencapai bumi, UVB lah yang paling banyak membakar kulit.⁹



Gambar 2. 1 Mekanisme *dermatoheliosis*¹⁰

2.1.2 Epidemiologi Dermatoheliosis

Frekuensi, lama, dan intensitas paparan sinar matahari merupakan faktor-faktor yang dapat mempercepat proses penuaan akibat radiasi UV. Individu yang tinggal di daerah dengan paparan sinar matahari yang tinggi (misalnya, daerah pesisir) lebih rentan terhadap photoaging. Faktor lain yang mempengaruhi photoaging adalah usia, jenis kelamin, dan kebiasaan merokok. Selain itu, merokok dapat mengganggu kemampuan kulit untuk beregenerasi dan mempercepat penuaan kulit.¹¹

Penelitian yang dilakukan oleh Respati *et al* pada tahun 2022, yang menggunakan responden subjek di Indonesia terutama di Jakarta menunjukkan bahwa indeks matahari rata-rata adalah 6,22.¹¹ World Health Organization (WHO) mendefinisikan *Ultraviolet Index (UVI)* sebagai perhitungan kekuatan radiasi ultraviolet (UV) yang menembus lapisan ozon

hingga mempunyai dampak ke tubuh kita berupa terbakar surya (sunburn) pada tempat dan waktu tertentu. Ukuran *UVI* ini bermanfaat untuk mengetahui tingkat kewaspadaan seseorang terhadap pajanan sinar surya yang dapat merusak tubuh disesuaikan dengan lokasi geografis yang bersangkutan setiap harinya.¹²



Gambar 2. 2 Klasifikasi UVI berdasarkan WHO, 2022¹²

Daerah tropis seperti Indonesia yang terletak di daerah katulistiwa dengan letak lintang rendah mempunyai UVI yang tinggi, dan bisa mencapai nilai UVI 10-11+ pada siang hari sehingga perlu diwaspadai bahaya terhadap efek samping pajanan matahari terutama pada siang hari.

Wanita dan pria dengan rentang usia 30-39 tahun, lentigo merupakan temuan DPAS yang paling umum diikuti dengan kerutan superfisial dan makula hipohiperpigmentasi. Kerutan dalam dan kerutan dangkal juga sering terjadi, disebabkan oleh peran melanin sebagai faktor penentu warna kulit. Lentigo (76%) sebagai bentuk kelainan yang paling umum pada pipi kanan dan kiri akibat paparan sinar matahari. Namun, kerutan dalam adalah yang

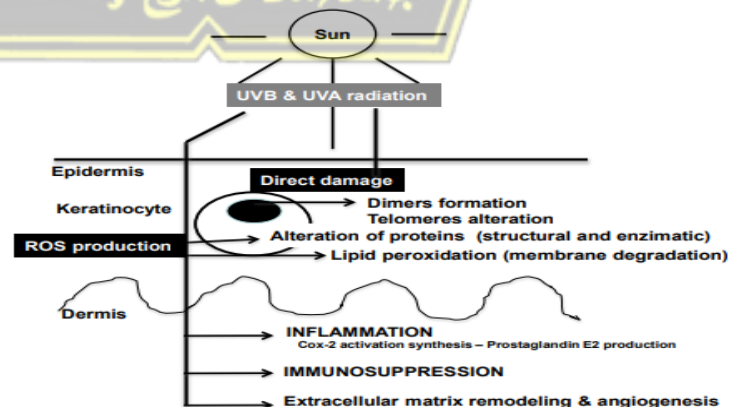
paling sedikit ditemukan di dagu (23%) dibandingkan dengan dahi, pipi kanan, dan pipi kiri (47%). Temuan ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa kerutan wajah biasanya dimulai di area sekitar mata, diikuti oleh dahi, dan terakhir di dagu, sesuai dengan proses penuaan.¹¹

2.1.3 Patogenesis Dermatoheliosis

Radiasi UV dapat menembus ke dalam kulit dan berinteraksi dengan sel-sel kulit, baik fibroblast maupun keratinosit, yang mengakibatkan keluarnya sejumlah faktor seperti sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan dan MMPs. Radiasi UVB dalam jumlah tinggi mencapai kulit kita dari sinar matahari langsung, tepat pada siang hari, ketika matahari berada diposisi teratas. Insiden radiasi UV adalah penyebab utama stress oksidatif pada kulit.

13

Mekanisme *fotoaging* melalui radiasi UV menginduksi ROS dan kerusakan DNA, inflamasi, immunosupresi dan remodeling matriks ekstraseluler diilustrasikan pada gambar 2.3.

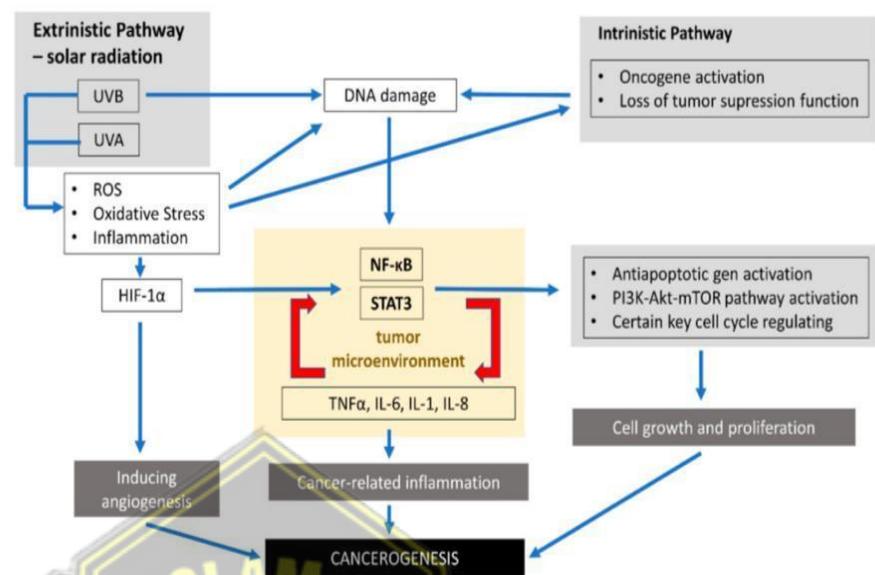


Gambar 2. 3 Efek kerusakan utama dari radiasi UV¹⁴

Sinar UV mempengaruhi homeostasis sel dan jaringan karena efeknya yang merusak integritas DNA, modifikasi ekspresi banyak gen, dan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Sistem perbaikan DNA melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh UVR. Tingkat ROS yang berlebihan mengakibatkan stres oksidatif, yakni ketidakseimbangan antara manifestasi sistemik ROS dan kemampuan organisme untuk mendetoksifikasi intermediet reaktif dalam memperbaiki kerusakan jaringan.

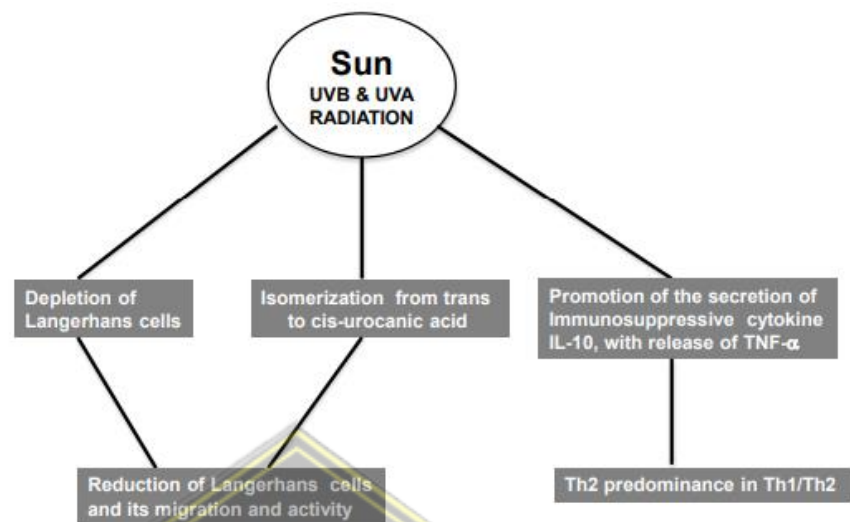
UV A dan UV B menyebabkan stress oksidatif, yang selanjutnya akan mengaktifkan NF-kB. Pelepasan NF-kB dari inhibitornya mengakibatkan translokasi NF-kB aktif ke nucleus untuk mengaktifkan sitokin inflamasi dan prostaglandin.

Radiasi UV menginduksi gen pro inflamasi. Inflamasi merupakan mediator dari *photoaging* dan *photocarcinogenesis*. Mediator inflamasi dilepaskan dari keratinosit, fibroblast, sel tumor, leukosit dan lapisan endotel pembuluh darah. Mediator inflamasi antara lain mediator plasma (bradikinin, plasmin, fibrin), mediator lipid (prostaglandin, leukotriene, dan faktor pengaktif trombosit), dan sitokin pro inflamasi (IL-1, IL-6 dan TNF- α).¹⁴



Gambar 2. 4 Jalur inflamasi persinyalan yang diinduksi UVR¹⁵

Radiasi UV menurunkan respon seluler dan humoral. Radiasi UV juga dapat menurunkan produksi sel Langerhans, yang merupakan mediator penting dari respon imun seluler karena perannya dalam mempresentasikan antigen. Selain menurunkan jumlah sel Langerhans, radiasi UV juga merusak fungsinya seperti gangguan presentasi antigen, mengurangi migrasi dan aktivitas sel Langerhans. Selain itu, radiasi UV meningkatkan sekresi sitokin immunosupresif yaitu IL-10. Sitokin ini mempunyai peran penting dalam immunosupresi pada kulit.¹⁴



Gambar 2. 5 Efek immunosupresif dari radiasi UV¹⁴

2.1.4 Diagnosis Dermatoheliosis

Tingkat *photodamage* secara signifikan dipengaruhi oleh etnis individu dan jenis kulit *Fitzpatrick* (FST). Individu berkulit putih (FST I-III) lebih rentan terhadap *photoaging* dibandingkan individu dengan kulit gelap (FST IV-VI). *Photoaging* wajah yang parah dapat mengakibatkan dua fenotipe klinis: ‘*hypertrophic*’ *photoageing* (HP) yang ditandai dengan kerutan dalam dan penampilan kasar atau ‘*atrophic*’ *photoageing* (AP) yang ditandai dengan telangiectasia, penampilan mengkilat dan hampir tembus pandang serta tidak berkerut, dan perkembangan berbagai neoplasma kulit jinak dan ganas.¹⁶

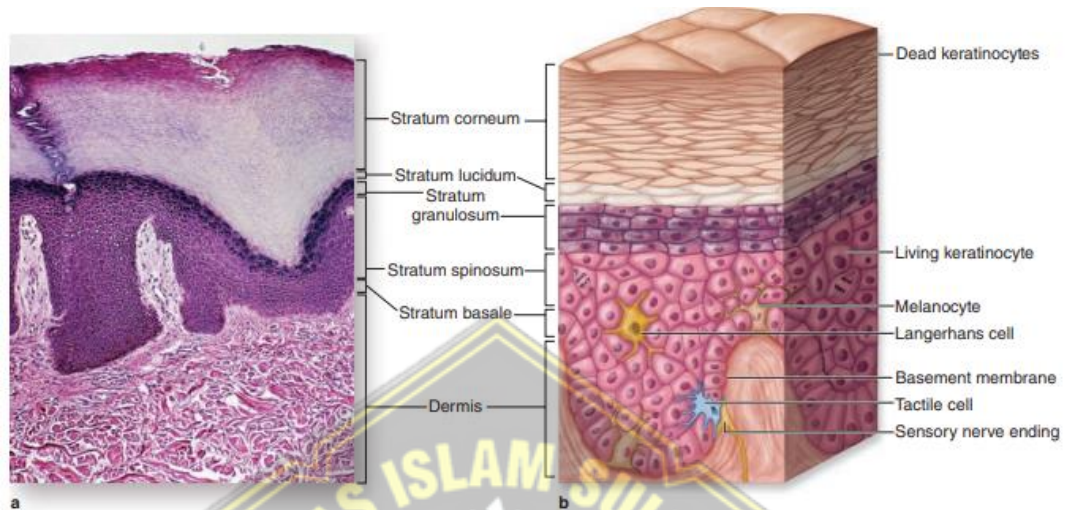


Gambar 2.6 Manifestasi klinis photoaging¹⁷

2.2 Histologi Kulit

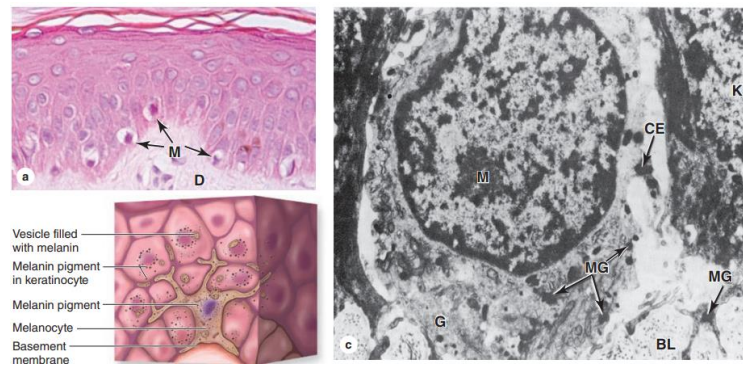
Lapisan kulit dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu lapisan epidermis dan lapisan dermis. Pada bawah dermis terdapat lapisan subkutan. Lapisan epidermis terdiri dari stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basal. Stratum korneum merupakan lapisan terluar kulit yang terdiri dari korneosit yang sudah mati dan terjadi proses deskuamasi pada lapisan ini. Stratum lucidum terdiri dari sel-sel yang jernih, tidak berinti, dan tidak memiliki organ. Pada stratum granulosum terdapat sel gepeng yang memiliki granula yaitu keratohialin atau badan lamellar. Stratum spinosum merupakan lapisan yang paling tebal dengan bentuk sel *polyhedral*. Pada lapisan ini nukleus dan nukleolus terlihat jelas dengan sitoplasma yang aktif mensekresikan keratin. Stratum basalis

memiliki bentuk sel selapis kuboid yang merupakan lapisan paling dasar epidermis.¹⁸



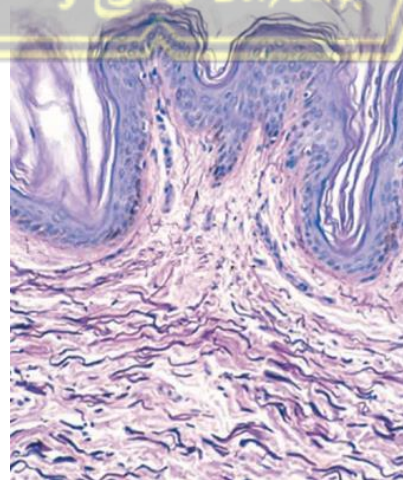
Gambar 2. 7 Lapisan epidermis dan dermis pada kulit¹⁸

Pada epidermis terdapat *stem cell*, melanosit, keratinosit, sel merkel, dan sel Langerhans. *Stem cell* yang merupakan sel imatur, melanosit yang menghasilkan melanin, dan sel merkel yang memiliki fungsi sebagai reseptor untuk sentuhan terletak di stratum basalis. Melanosit memiliki bentuk sel bercabang serta nukleus sentral yang mengandung organel untuk sintesis protein. Melanosit dan keratinosit hanya dapat dilihat dengan pewarnaan hematoksilin eosin. Keratinosit dapat ditemukan di stratum basalis hingga stratum spinosum. Sel ini merupakan struktur terbanyak di kulit. Hasil dari sel keratinosit berupa keratin, antibodi, dan enzim. Sel Langerhans terdapat pada lapisan stratum spinosum yang berperan pada sistem imun sebagai makrofag. Sedangkan sel merkel dan sel Langerhans hanya dapat dilihat dengan pewarnaan histokimia.¹⁸



Gambar 2. 8 Melanosit pada stratum basalis¹⁸

Dermis terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan papilar dan lapisan retikular. Lapisan papilar terdiri dari jaringan ikat yang longgar yang diantaranya terdapat pembuluh darah, pembuluh limfe, dan saraf sensoris. Jaringan ikat yang longgar ini terdiri dari kolagen tipe I dan III, fibroblast, serta sel dendritik. Struktur berbentuk papil dapat berupa papil vaskular dan papil saraf. Lapisan retikuler merupakan lapisan yang paling tebal pada kulit. Terdapat jaringan ikat padat teratur, serabut kolagen, dan serta serat-serat elastis.¹⁸



Gambar 2. 9 Lapisan dermis terdiri dari serat-serat elastis¹⁸

Pada kulit tebal seluruh lapisan dermis dapat terlihat sedangkan pada kulit tipis tidak terdapat stratum lusidum. Folikel rambut dan kelenjar sebacea hanya terdapat pada kulit tipis. kelenjar keringat dapat ditemukan pada kulit tipis maupun tebal.¹⁸

2.3 IL-1 pada Kulit

IL-1 adalah pengatur utama inflamasi melalui pengontrolan berbagai proses imun bawaan. IL-1 memiliki berbagai fungsi biologis, yang bertindak sebagai pirogen leukosit, mediator demam dan mediator endogen leukosit, dan penginduksi beberapa komponen respons fase akut dan *lymphocyte-activating factor* (LAF).^{19,20} Keluarga sitokin dan reseptor interleukin-1 (IL-1) unik dalam imunologi karena keluarga IL-1 dan *Toll-like receptor* (TLR) memiliki fungsi yang serupa. Dibandingkan dengan dari keluarga sitokin lainnya, keluarga IL-1 terutama terkait dengan kekebalan bawaan. Lebih dari 95% organisme hidup menggunakan mekanisme kekebalan bawaan untuk bertahan hidup sedangkan kurang dari 5% bergantung pada fungsi sel-T dan sel-B. Kekebalan bawaan dimanifestasikan oleh peradangan, yang dapat berfungsi sebagai mekanisme pertahanan tuan rumah tetapi bila tidak terkendali merugikan kelangsungan hidup.

Reseptor IL-1 dan keluarga TLR mengandung domain *Toll-IL-1-Receptor* (TIR) sitoplasma. 50 domain TIR asam amino sangat homolog dengan protein Toll di *Drosophila*. Domain TIR hampir sama dan hadir di setiap TLR dan setiap keluarga reseptor IL-1. Keluarga IL-1 IL-1a dan IL-33 juga berfungsi sebagai DAMP. Meskipun sifat inflamasi dari famili IL-1

mendominasi pada imunitas bawaan, anggota famili IL-1 dapat berperan dalam imunitas yang didapat. IL-1 α , sebuah sitokin yang juga terdapat pada kulit yang diradiasi, secara substansial dan sinergis meningkatkan induksi TNF- α oleh UVB, dan induksi TNF- α oleh kombinasi UVB dengan IL-1 α dimediasi melalui peningkatan transkripsi gen TNF- α .^{21,22}

Tabel 2.1 Anggota keluarga IL-1

IL-1 family members	Receptor	Property
IL-1 α	IL-1RI	Inflammatory
IL-1 β	IL-1RI	Inflammatory
IL-1Ra	IL-1RI	IL-1RI antagonist
IL-18	IL-18R α	Inflammatory
IL-33	ST2	Th2 inflammation
IL-36Ra	IL-1Rrp2	IL-1Rrp2 antagonist
IL-36 α	IL-1Rrp2	Inflammatory
IL-36 β	IL-1Rrp2	Inflammatory
IL-36 γ	IL-1Rrp2	Inflammatory
IL-37	IL-18R α	Anti-inflammatory
IL-38	IL-1Rrp2	IL-1Rrp2 antagonist

2.4 TNF- α pada Kulit

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) adalah sitokin yang memiliki efek pleiotropik pada berbagai jenis sel. Telah diidentifikasi sebagai pengatur utama respons inflamasi dan diketahui terlibat dalam patogenesis beberapa penyakit inflamasi dan autoimun. Secara struktural, TNF- α adalah protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino, terutama dihasilkan oleh makrofag aktif, limfosit T, dan *natural killer cell* (Sel NK). Secara fungsional, TNF- α diketahui memicu serangkaian berbagai molekul inflamasi, termasuk

sitokin dan kemokin lainnya. Secara fisiologis, TNF- α merupakan komponen penting untuk respons imun yang normal. TNF- α dapat mengaktifkan dan meregulasi sistem kekebalan. Upregulasi TNF- α adalah respons awal utama terhadap ultraviolet B (UVB) oleh sel keratinosit, dan merupakan komponen penting dari kaskade inflamasi pada kulit. Radiasi UVB menginduksi ekspresi TNF- α pada sel keratinosit dan fibroblas dermal, dengan induksi mRNA TNF- α terlihat sedini 1,5 jam setelah UVB.^{23,24}

2.5 Daun Sawo (Manilkara zapota)

2.5.1 Klasifikasi Manilkara zapota

Manilkara zapota L. umumnya disebut sebagai sawo atau juga dikenal secara lokal sebagai sofeda di Bangladesh, termasuk dalam keluarga *Sapotaceae*.^{25,26} Asia adalah pembudidaya utama spesies ini.²⁷ Meskipun *Manilkara zapota* adalah spesies tanaman umum di benua Amerika yang digunakan sebagai sumber makanan.^{28,29}

2.5.2 Ekstrak Daun Manilkara zapota

Berbagai konstituen diisolasi dari *Manilkara zapota L.* yaitu metil klorogenat, asam caffeic, dihydromyricetin, quercitrin, asam 4-O-galloylchlorogenic, myricetin-3-O- α -L-rhamnoside, catechin, apigenin-7-O- α -L-rhamnoside, epicatechin.³⁰

Secara kualitatif daun M Zapota mengandung phenol dan flavonoid dan studi fitokimia tunggal melaporkan isolasi lupeol asetat,

asam oleanolic, apigenin-7-O- α -l-rhamnoside, myricetin-3-O- α -l-rhamnoside, dan asam caffeic.²⁹

Daun tanaman memiliki aktivitas anti-inflamasi karena *M. zapota* mengandung senyawa seperti steroid (glycosides, cardiac glycosides), terpenoids, and flavonoids.³¹

2.6 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Manilkara zapota Terhadap IL 1 dan TNF- α Pada Tikus Wistar Yang Diinduksi UV

Phytoconstituents seperti flavonoid, tannin, terpenoid, steroid, glikosida merupakan aktivitas anti-inflamasi pada tanaman. Aktivitas anti-inflamasi yang diamati dari daun tanaman yang dapat dikaitkan dengan beberapa konstituen aktif seperti lupeol asetat, asam oleanolat, apigenin-7-O- α -L-rhamnoside dan myricetin-3-O- α -L-rhamnoside.³²

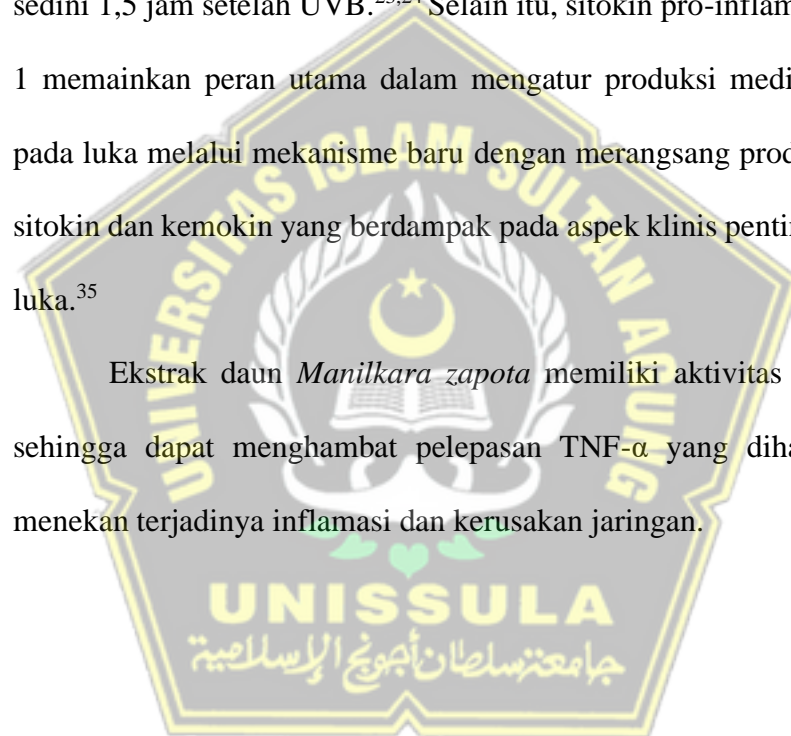
Penyembuhan luka adalah proses yang sangat kompleks yang melibatkan aktivasi berbagai jenis sel, produksi berbagai sitokin, kemokin dan banyak faktor yang mempengaruhi respon imun, sehingga rentan terhadap kesalahan. Ketidakseimbangan yang mungkin timbul dalam molekul pensinyalan proinflamasi dan antiinflamasi menyebabkan respons inflamasi yang terlalu kuat dan berkepanjangan yang menyebabkan jaringan parut patologis.³³

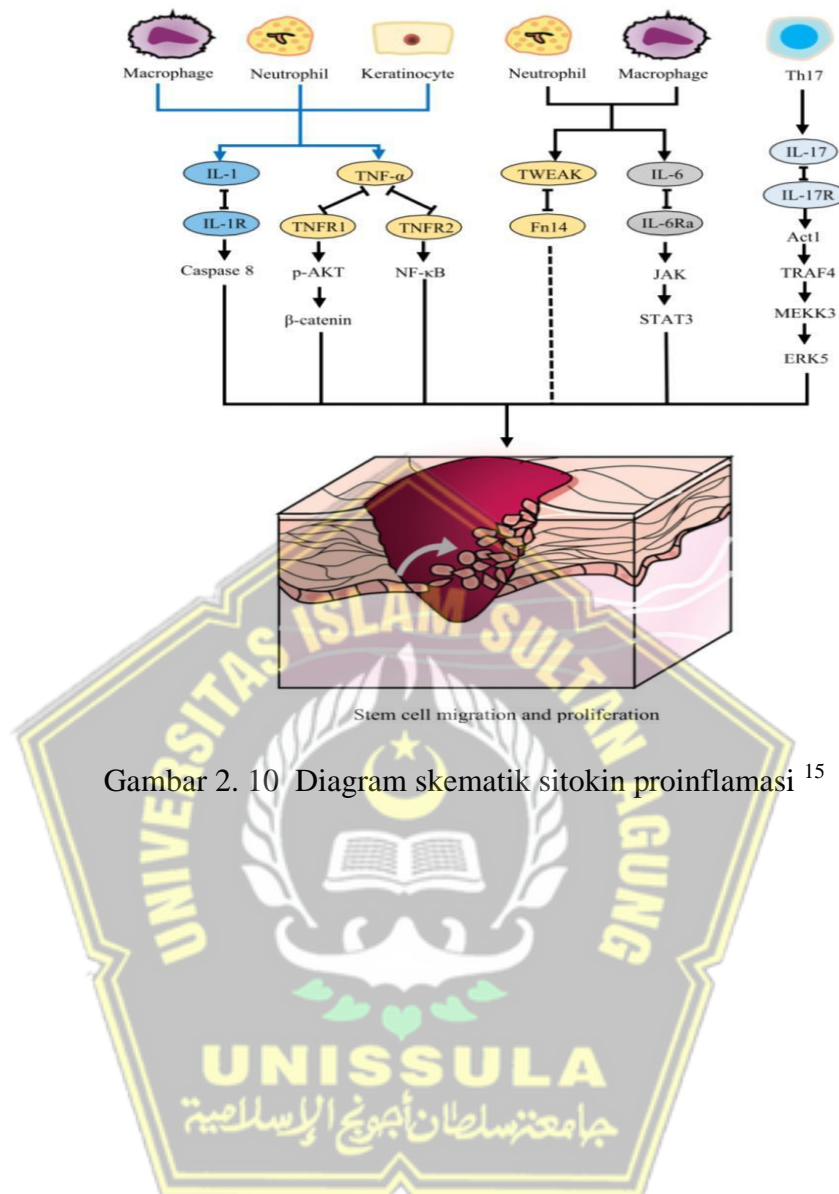
Respon inflamasi adalah mekanisme pertahanan luka pertama dan sangat penting untuk keseluruhan proses penyembuhan. Terdapat keseimbangan antara sinyal anti-inflamasi dan pro-inflamasi dalam respon

inflamasi, namun peradangan yang berlebihan berbahaya untuk perbaikan jaringan.³⁴

Upregulasi TNF- α adalah respons awal utama terhadap ultraviolet B (UVB) oleh sel keratinosit, dan merupakan komponen penting dari kaskade inflamasi pada kulit. Radiasi UVB menginduksi ekspresi TNF- α pada sel keratinosit dan fibroblas dermal, dengan induksi mRNA TNF- α terlihat sedini 1,5 jam setelah UVB.^{23,24} Selain itu, sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 memainkan peran utama dalam mengatur produksi mediator inflamasi pada luka melalui mekanisme baru dengan merangsang produksi beberapa sitokin dan kemokin yang berdampak pada aspek klinis penting dari biologi luka.³⁵

Ekstrak daun *Manilkara zapota* memiliki aktivitas anti inflamasi sehingga dapat menghambat pelepasan TNF- α yang diharapkan dapat menekan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan.





Gambar 2. 10 Diagram skematik sitokin proinflamasi ¹⁵

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Sinar UV mempengaruhi homeostasis sel dan jaringan karena efeknya yang merusak integritas DNA, modifikasi ekspresi banyak gen dan pembentukan *reactive oxygen species (ROS)*. ROS menyerang peradangan jaringan dan menginduksi kompleks protein intraseluler, seperti infamasi. Tingkat ROS yang berlebihan mengakibatkan stress oksidatif, yang merupakan ketidakseimbangan antara manifestasi sistemik ROS dan kemampuan organisme untuk mendetoksifikasi intermediet reaktif dan untuk memperbaiki kerusakan yang diakibatkannya.¹⁵

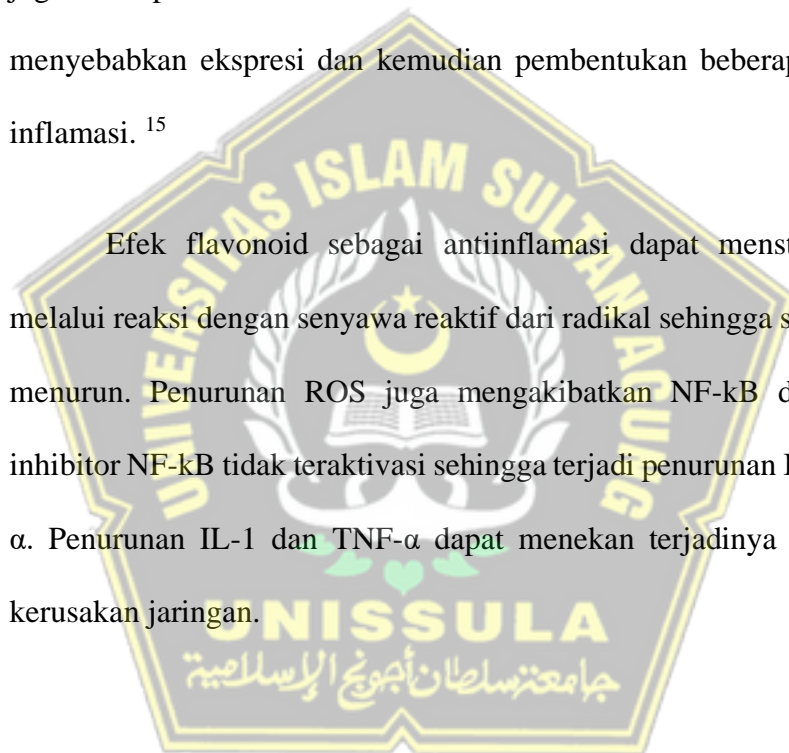
Radiasi UVB jauh lebih sitotoksik dan mutagenik pada jaringan kulit. Radiasi UVA 1000 kali lebih sedikit mutagenic daripada radiasi UVB. Radiasi UVB ditahan oleh lapisan tanduk epidermis. Radiasi UVB bekerja pada lapisan superfisial kulit hingga ke tingkat lapisan basal. Dengan mempengaruhi terutama sel-sel keratinosit, melanosit dan Langerhans sehingga menyebabkan luka bakar dan eritema kulit dan berkontribusi pada kerusakan struktur DNA.¹⁵

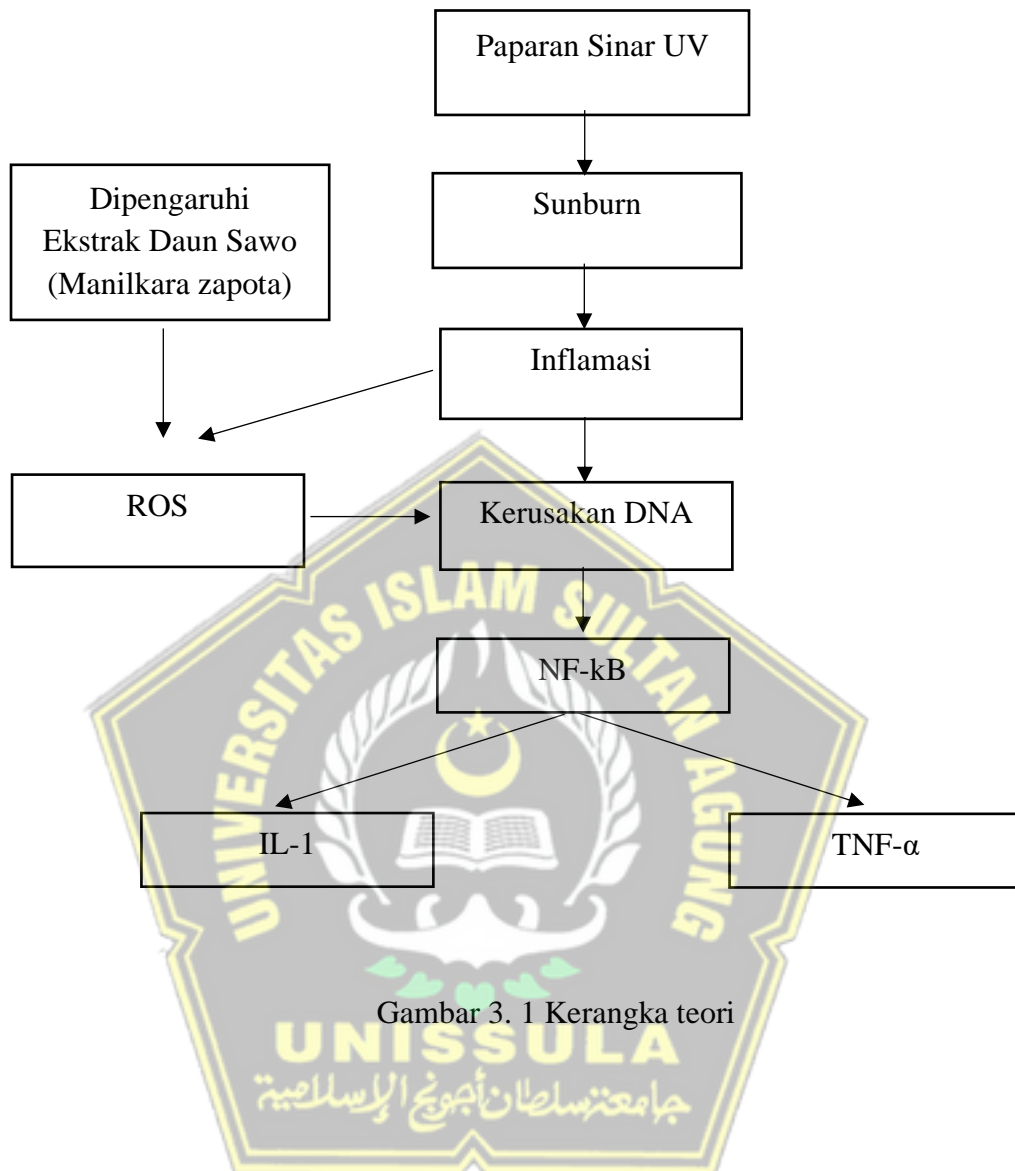
UV radiasi dapat mengaktifkan keratinosit, Keratinosit teraktivasi dengan sel dendritic (DC), melanosit, dan sel Langerhans (LC) menghasilkan sitokin pro inflamasi yang terlibat dalam peningkatan

regulasi reaksi inflamasi dan yang memodulasi respon imun adaptif dan bawaan.

Peningkatan kadar ROS dapat mengaktifkan jalur nuclear factor kappa B (NF- κ B). Aktivasi NF- κ B meningkatkan regulasi faktor inflamasi utama, termasuk IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α . Faktor inflamasi, disisi lain, juga merupakan activator NF- κ B. Aktivasi NF- κ B dalam sel imun menyebabkan ekspresi dan kemudian pembentukan beberapa sitokin pro inflamasi.¹⁵

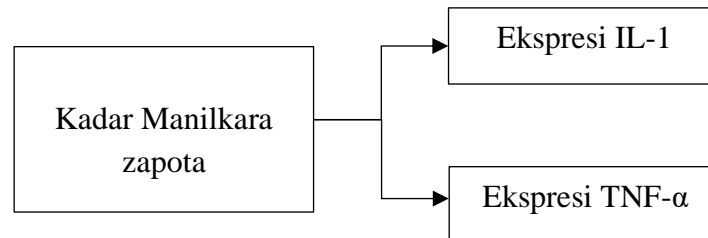
Efek flavonoid sebagai antiinflamasi dapat menstabilkan ROS melalui reaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga stress oksidatif menurun. Penurunan ROS juga mengakibatkan NF- κ B dan fosforilasi inhibitor NF- κ B tidak teraktivasi sehingga terjadi penurunan IL-1 dan TNF- α . Penurunan IL-1 dan TNF- α dapat menekan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan.





Gambar 3. 1 Kerangka teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3. 2 Kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

Terdapat pengaruh pada pemberian krim ekstrak daun *Manilkara zapota* terhadap IL-1 dan TNF- α pada tikus wistar yang diinduksi UVB.

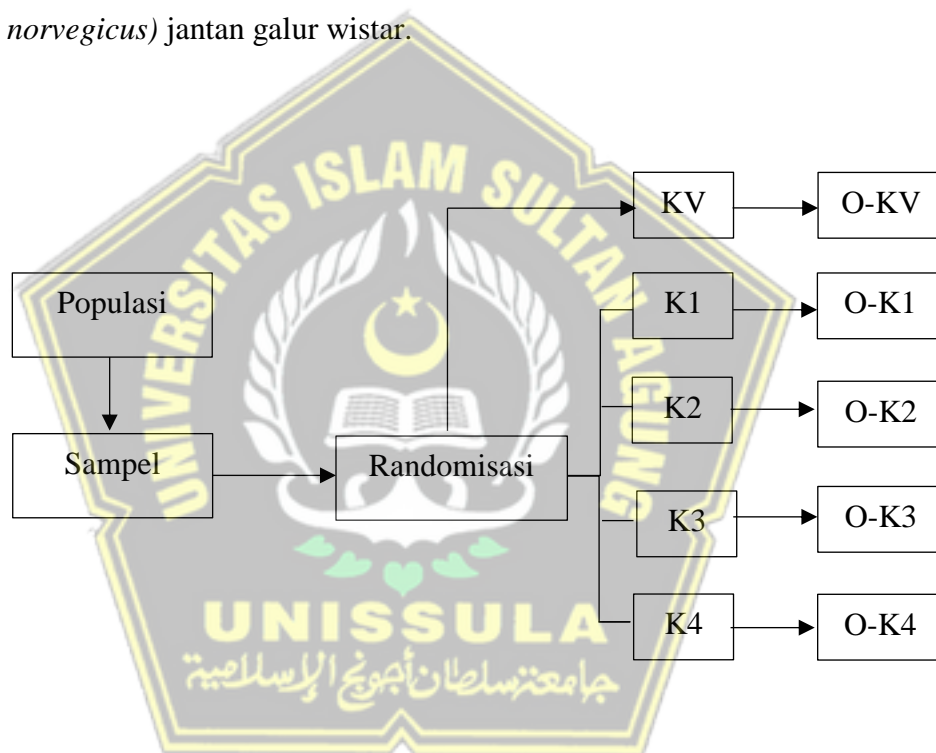


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental *post-test only control group design* yang menggunakan objek penelitian tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

KV : Kelompok validasi

K1 : Kelompok tikus sebagai kontrol tanpa perlakuan (kontrol sehat)

K2 :Kelompok tikus dengan pemberian sinar UVB selama 3 hari kemudian diberikan krim placebo selama 3 hari sebanyak 1,5 gram

K3 : Kelompok tikus dengan pemberian sinar UVB selama 3 hari kemudian diberikan krim ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) 25% selama 3 hari sebanyak 1,5 gram

K4 : Kelompok tikus dengan pemberian sinar UVB selama 3 hari kemudian diberikan krim ekstrak daun sawo 50% selama 3 hari sebanyak 1,5 gram

O-KV : Observasi/ pengamatan pewarnaan HE kelompok validasi.

O-K1 : Observasi/ pengukuran ekspresi IL-1 dan TNF- α pada kelompok K1.

O-K2 : Observasi/ pengukuran ekspresi IL-1 dan TNF- α pada kelompok K2.

O-K3 : Observasi/ pengukuran ekspresi IL-1 dan TNF- α pada kelompok K3.

O-K4 : Observasi/ pengukuran ekspresi IL-1 dan TNF- α pada kelompok K4.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus strain Wistar jantan dewasa (2-3 bulan; 190-210 g). Sebelum memulai penelitian, tikus menjalani periode penyesuaian selama 7 hari. Tikus dikandangkan secara individual dan dipelihara pada suhu konstan dan diberi makan diet normal dan akses minum secara bebas.

A. Kriteria Inklusi Penelitian

1. Tikus jantan galur Wistar
2. Tikus berumur 2 – 3 bulan
3. Berat badan 190 – 210 gram
4. Kondisi sehat

B. Kriteria Eksklusi Penelitian

1. Kelainan kulit
2. Tikus coba diluar range 190 – 210 gram

C. Kriteria *Drop Out*

1. Tikus coba mengalami kematian.
2. Tikus coba mengalami infeksi pada kulit.

4.2.2 Sampel

Pengambilan sampel untuk penelitian eksperimental, menggunakan rumus

Federer:

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok = 4

n = Jumlah sampel per kelompok

Berdasarkan rumus diatas, maka jumlah sampel dalam tiap kelompok dapat dihitung:

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

$$(3n - 3) \geq 15$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$

Pada penelitian ini jumlah sampel untuk tiap kelompok ditentukan sebanyak 6 ekor tikus, dan jumlah kelompok sampel ada 4, sehingga penelitian ini membutuhkan 24 ekor tikus dari $(t-1)(n-1) \geq 15$ populasi yang ada. Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan

koreksi dengan rumus: $n / 1-DO$, dimana proporsi unit eksperimen yang hilang atau *drop out* sebanyak 10%, maka:

$$N \text{ akhir tiap kelompok} = n / 1-DO$$

$$N = 6 / 1 - 10\%$$

$$N = 7$$

Jumlah sampel dalam setiap kelompok adalah 7 ekor tikus. Sehingga untuk 4 kelompok, diperlukan sampel sebanyak 28 ekor tikus.

4.2.3 Teknik Sampling

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan Teknik *probability sampling* dengan cara pengambilan sampel dalam populasi yang mempunyai kesempatan yang sama untuk dipilih menjadi sampel. Sistem yang digunakan yaitu pengambilan sampel secara acak dan sangat sederhana (*simple random sampling*). Semua tikus *Wistar* yang memenuhi kriteria untuk penelitian sejumlah 31 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara random, setiap kelompok terdiri atas 7 ekor tikus. Terdapat satu kelompok kontrol dan lainnya sebagai kelompok perlakuan, untuk validasi ditambahkan satu ekor pada kelompok kontrol (K1) dan dua ekor pada kelompok perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Penelitian

4.3.1.1 Variabel bebas

Pemberian krim ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) dosis 25% dan 50%.

4.3.1.2 Variabel Prakondisi

Paparan sinar UV B

4.3.1.3 Variabel terikat

Kadar IL-1 dan TNF- α .

4.3.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun sawo adalah ekstrak dari daun sawo (*Manilkara zapota*) menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan krim dengan konsentrasi 25% dan 50% melalui tahap pembuatan simplisia, maserasi dan evaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Pada daun sawo diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, glikosida, tannin dan saponin, flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan anti inflamasi yang membantu untuk menangkal radikal bebas yang mencetuskan inflamasi. Hasil ukur mg dengan skala ordinal.
2. Kadar IL-1 merupakan sitokin pro-inflamasi yang memainkan peranan penting dalam mengatur respon imun dan menjaga homeostasis imun, yang diambil dari sampel jaringan kulit dan

diperiksa dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Satuan hasil menggunakan pg/mL dengan skala rasio.

3. Kadar TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi yang memainkan peranan penting dalam mengatur respon imun dan menjaga homeostasis imun, yang diambil dari sampel jaringan kulit dan diperiksa dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Satuan hasil menggunakan ng/L dengan skala rasio.

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Ekstrak ethanol daun *Manilkara zapota*
2. Akuabides
3. Ketamine
4. Alkohol 70%, 80%, parafin,
5. Fine test ELISA kit Rat TNF- α
6. Fine test ELISA kit Rat IL-1

4.4.2 Instrumen Penelitian

1. Kandang berukuran 55 x 22 x 22 cm dilengkapi dengan tempat pakan dan minum
2. Lampu UV-B
3. Timbangan digital
4. Pipa PVC
5. Spuit 3 dan 5 ml

6. Alat untuk membuat sampel pemeriksaan (pisau scalpel)
7. Alat-alat ekstraksi ethanol daun *Manilkara zapota*: oven, botol maserasi, *rotary evaporator*
7. Alat-alat penunjang pembuatan sediaan krim: cawan porselen, pemanas air, mortar.

4.5 Alur Penelitian

4.5.1 Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian di ajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2 Pembuatan Krim Ekstrak Daun *Manilkara zapota*

Sampel daun Sawo segar sebanyak 1 kg, dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir. Daun kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40° C. Simplisia dicek kadar airnya dengan *moisture balance* (Depkes RI, 1985). Hasil pengeringan simplisia dianggap baik jika kadar air di bawah 10%. Simplisia kemudian dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal selama proses pengeringan, dipotong kecil-kecil, dan ditimbang kemudian diblender menjadi serbuk. Serbuk daun diayak dengan ayakan ukuran 20 mesh. 450 gram serbuk simplisia daun diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1.500 ml. Serbuk simplisia daun dimasukkan kedalam botol berwarna gelap secara terpisah. Kemudian simplisia direndam menggunakan pelarut etanol selama 3 hari dan sesekali diaduk 3 kali sehari, setelah 3 hari kemudian

disaring dan ampasnya dimaserasi ulang selama 2 hari dengan etanol 96% sebanyak 1.500ml. pengulangan dilakukan sebanyak dua kali. Filtrat yang terkumpul kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental daun sawo yang diperoleh dihitung rendemennya, kemudian dibuat dalam bentuk krim 25% dan 50%.³⁶

4.5.3 Perlakuan pada Hewan Coba

Subjek penelitian ialah 28 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*), berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 190-210 gr, yang terbagi menjadi 4 kelompok, masing-masing berjumlah 7 ekor tikus. Tikus yang sudah diadaptasi selama 7 hari dibius dengan campuran ketamin (60 mg/kgbb) dan xylazine (20mg/bb), kemudian rambut pada bagian dorsal tikus dicukur hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160 mJ/cm²/hari selama 3 hari. Tikus kemudian diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Diberikan perlakuan secara topikal sebanyak satu kali sehari selama 3 hari pasca penyinaran UV B.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1 Tempat Penelitian

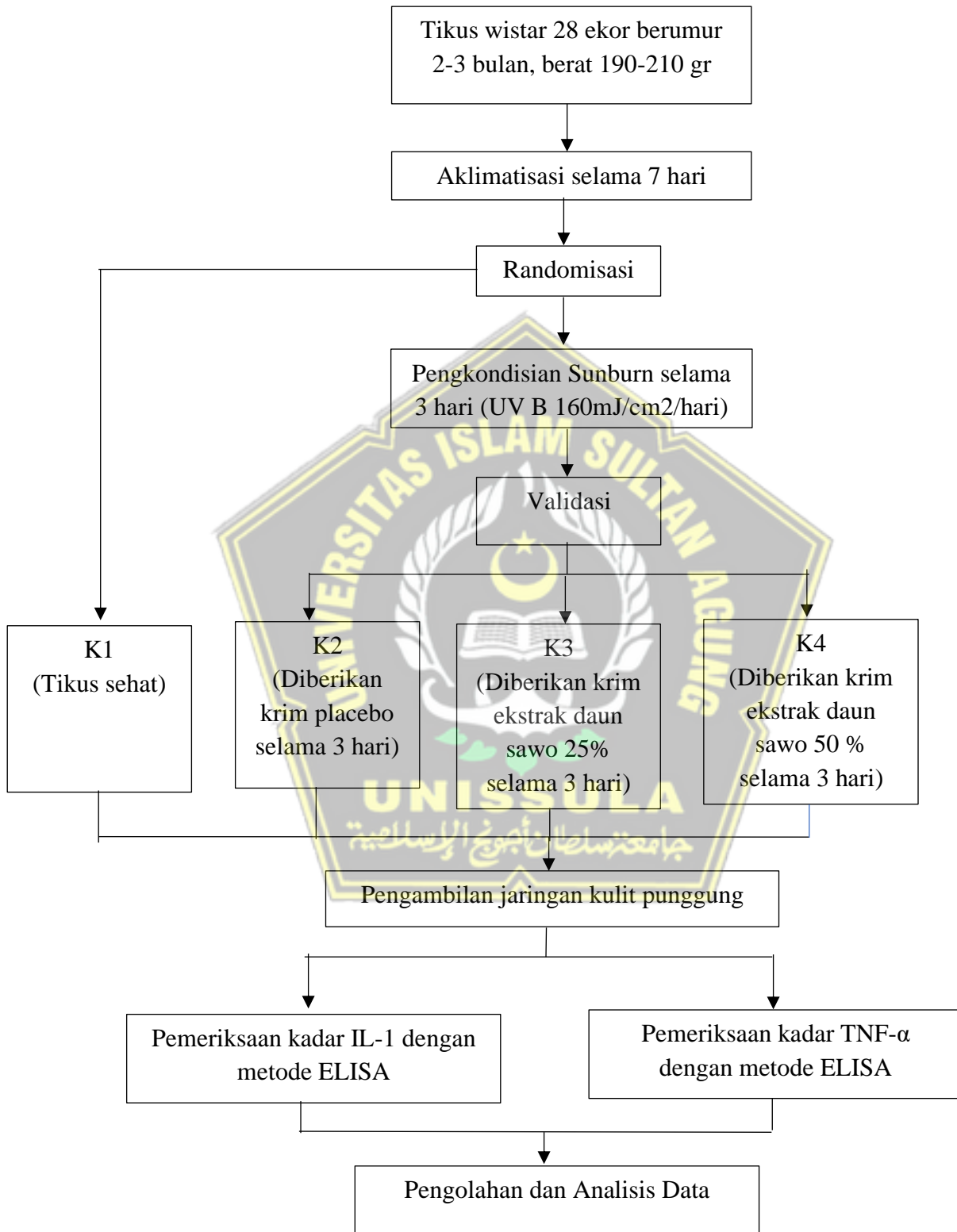
Pengambilan sampel penelitian dilakukan di Laboratorium IBL FK UNISSULA.

4.6.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2023-Januari 2024



4.7 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Alur Kerja

4.8 Analisis Data

Analisis bertujuan untuk menguji hipotesis penelitian. Hipotesis yang diuji adalah pemberian ekstrak ethanol daun *Manilkara zapota* dapat menurunkan kadar IL-1 dan TNF- α pada epidermis tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang dipapar radiasi Ultraviolet-B. Hasil penelitian yang didapat kemudian dianalisis dan disajikan menggunakan analisis deskriptif, normalitas data dengan *Shapiro-wilk test*, homogenitas data dengan *Levene's Test*, dan uji komparabilitas dengan *one-way Anova*, kemudian dilakukan uji *Least Significant Differences test (LSD)*.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Integrated Biomedical Laboratory* IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Total subjek dalam penelitian berjumlah 31 ekor tikus *Wistar* jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, setiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus *Wistar* jantan. Subjek tambahan untuk kelompok validasi menggunakan 3 ekor tikus yang di bagi 1 ekor pada kelompok kontrol, dan 2 ekor pada kelompok perlakuan.

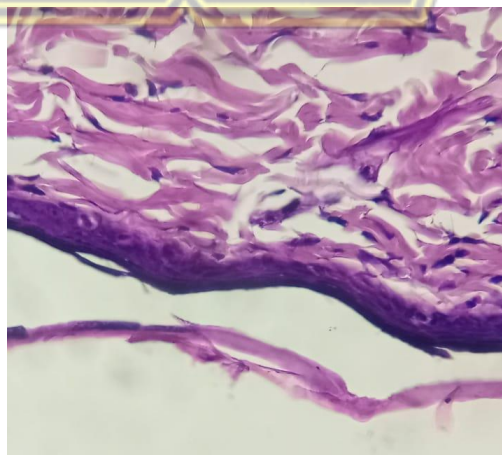
Penelitian ini dilakukan dengan memaparkan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160 mJ/cm²/hari selama 3 hari. Setelah paparan UV kelompok validasi dilakukan pengambilan sampel jaringan kulit untuk dibuat pewarnaan preparat *Hematoxilin eosin* (HE) dan dilakukan pengamatan. Kelompok K1 tidak diberikan perlakuan, Kelompok K2 diberikan perlakuan secara topikal menggunakan krim placebo, Kelompok K3 diberikan perlakuan secara topikal krim ekstrak daun sawo dosis 25% dan Kelompok K4 diberikan perlakuan secara topikal krim ekstrak daun sawo dosis 50%. Setelah perlakuan selama 3 Hari, Hari ke 4 sampel jaringan kulit tikus *Wistar* diambil untuk dianalisa ekspresi IL-1 dan TNF- α dengan metode *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

5.1.1 Kandungan flavonoid dan fenol ekstrak daun sawo (*Manilkara zapota*) dan hasil validasi pewarnaan HE pada tikus yang dipapar UV-B

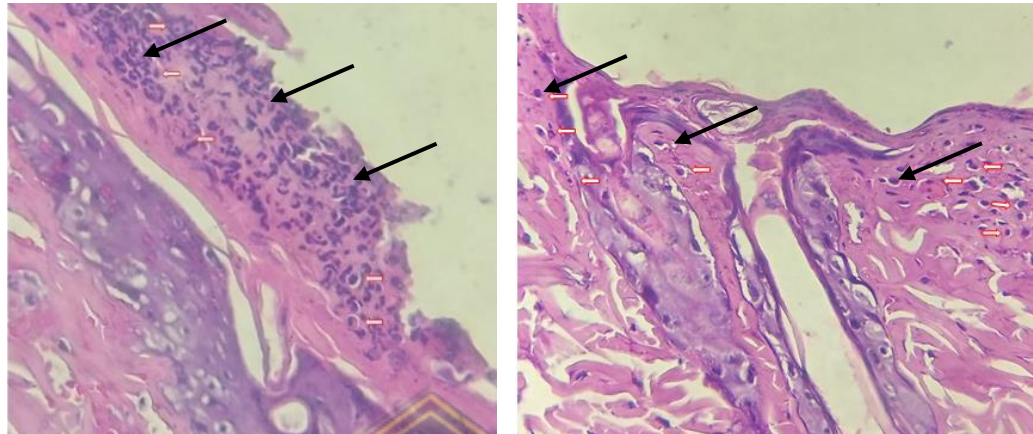
Secara kualitatif daun sawo mengandung senyawa phenol dan flavonoid.²⁹ Analisis secara kuantitatif kandungan ekstrak daun sawo didapatkan hasil kadar phenol dengan 3 kali pengulangan didapatkan hasil rata-rata sebesar 170,1 mg/ml, sedangkan hasil kadar flavonoid yang dianalisa dengan 3 kali pengulangan didapatkan hasil rata-rata sebesar 56,8 mg/ml.

Subjek penelitian dipaparkan UV light (broadband dengan peak emission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160 mJ/cm²/hari selama 3 hari. Hari ke 4 sampel jaringan kulit diambil untuk dibuat preparat histopatologi anatomi dengan pewarnaan HE, hasil pengamatan dilakukan oleh ekspertis patologi anatomi.

Hasil pemeriksaan patologi anatomi menunjukkan pada panah hitam preparat HE kelompok perlakuan ditemukan *sunburn cell* sedangkan pada kelompok kontrol tidak ditemukan *sunburn cell*, pengamatan dilakuakn dengan mikroskop pada perbesaran 40x.



Gambar 5.1 Hasil pewarnaan HE kelompok kontrol pada pembesaran 40x.



Gambar 5.2 Hasil pewarnaan HE tikus yang dipapar UV-B pada kelompok perlakuan pada pembesaran 40x.

5.1.2 Analisis ekspresi IL-1 pada tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo

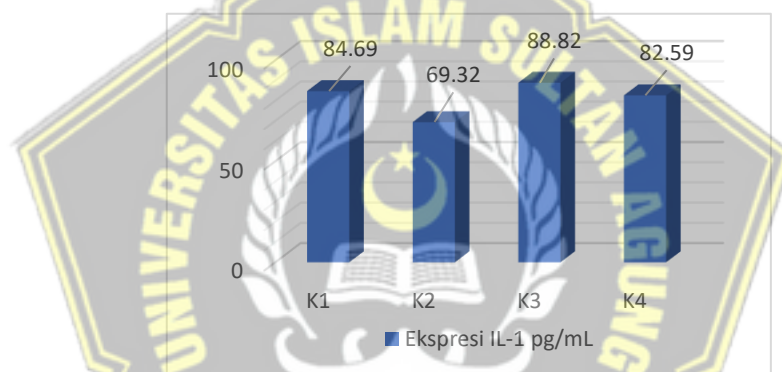
Hasil analisis deskriptif ekspresi IL-1 pada masing-masing kelompok subjek penelitian ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil uji deskriptif ekspresi IL-1 dan uji *One way anova* tiap kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo.

Kelompok	K1 (Kontrol)	K2 (Placebo)	K3 Dosis 25%	K4 (Dosis 50%)	<i>P value</i>
Ekspresi IL-1 (pg/mL)					
Tikus 1	89.51	84.15	101.21	79.31	
Tikus 2	65.07	63.29	74.85	82.59	
Tikus 3	92.49	71.50	62.51	72.96	
Tikus 4	82.08	59.00	98.38	97.17	
Tikus 5	99.49	65.75	95.24	99.47	
Tikus 6	79.51	72.28	92.85	54.27	
Mean±SD	84,69±12,01	69,32±8,82	88,82±26,06	82,59±17,62	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,878*	0,722*	0,163*	0,929*	
<i>Leuvene Test</i>					0,084*
<i>One way Anova</i>					0,197

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
 * *Leuvene Test* = Homogen ($p > 0,05$)
 * *One way Anova* = Signifikan ($p < 0,05$)

Rata-rata ekspresi IL-1 pada kontrol positif (K1) adalah 84,69 pg/mL, rata-rata ekspresi IL-1 paling rendah pada kelompok krim placebo (K2) 69,32 pg/mL, sedangkan rata-rata ekspresi IL-1 paling tinggi pada kelompok perlakuan krim ekstrak daun sawo dosis 25% (K3) yaitu 88,82 pg/mL dan rata-rata ekspresi IL-1 pada kelompok perlakuan krim ekstrak daun sawo dosis 50% (K4) yaitu 82,59 pg/mL.



Gambar 5.3 Grafik rata-rata ekspresi IL-1 antar kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo

Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan bahwa data ekspresi IL-1 terdistribusi normal ($p > 0,05$), dan memiliki variasi data yang homogen dengan hasil 0,084 ($p > 0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan homogen, memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistik parametrik, untuk membandingkan rata-rata ekspresi IL-1 antar kelompok dilakukan uji *One way anova* dan dilakukan uji *Post Hoc LSD* untuk melihat dosis mana yang paling berpengaruh.

Hasil rata-rata ekspresi IL-1 antar kelompok yang dibuktikan dengan Uji *One way anova* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Uji *One way anova* diperoleh hasil nilai p sebesar 0,197 ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata ekspresi IL-1 yang bermakna antar kelompok, sehingga tidak perlu dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak daun sawo tidak berbeda signifikan dalam menurunkan ekspresi IL-1 dibandingkan kelompok positif tanpa perlakuan.

5.1.3 Analisis ekspresi TNF- α pada tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo

Hasil analisis deskriptif ekspresi TNF- α pada masing-masing kelompok subjek penelitian ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut:

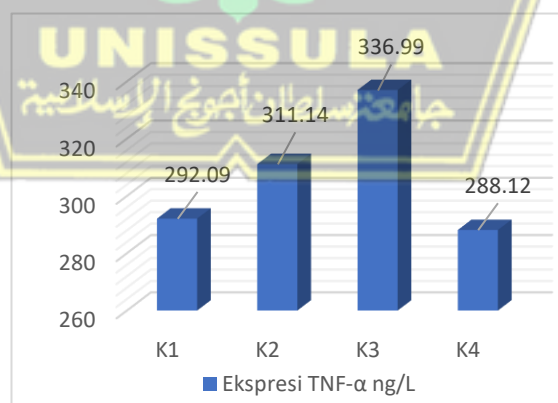
Tabel 5. 2 Hasil uji deskriptif ekspresi TNF- α dan uji *One way anova* tiap kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo.

Kelompok	K1 (Kontrol)	K2 (Placebo)	K3 Dosis 25%	K4 (Dosis 50%)	<i>P value</i>
Ekspresi TNF-α (ng/L)					
Tikus 1	294.07	304.73	304.73	301.39	
Tikus 2	309.45	282.37	282.37	316.81	
Tikus 3	271.46	317.18	317.18	284.22	
Tikus 4	250.45	262.94	262.94	290.22	
Tikus 5	326.4	335.72	335.72	276.01	
Tikus 6	300.75	363.91	363.91	260.11	
Mean \pm SD	292,09 \pm 27,26	311,14 \pm 36,37	336,99 \pm 26,06	288,12 \pm 19,74	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,901*	0,992*	0,094*	1,000*	
<i>Leuvene Test</i>					0,527*
<i>One way Anova</i>					0,036*

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
 * *Leuvene Test* = Homogen ($p > 0,05$)
 * *One way Anova* = Signifikan ($p < 0,05$)

Rata-rata ekspresi TNF- α paling rendah pada kelompok perlakuan krim ekstrak daun sawo dosis 50% (K4) yaitu 288,12 ng/L, dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K1) yaitu 292,09 ng/L, sedangkan rata-rata ekspresi IL-1 paling tinggi pada kelompok krim ekstrak daun sawo dosis 25% yaitu 336,99 ng/L, dan rata-rata ekspresi IL-1 pada kelompok krim placebo (K2) yaitu 311,14 ng/L.

Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan bahwa data ekspresi TNF- α terdistribusi normal ($p > 0,05$), dan memiliki variasi data yang homogen ($p > 0,05$). Hasil data yang terdistribusi normal dan homogen, memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistik parametrik, untuk membandingkan rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok dilakukan uji *One-Way ANOVA* dan dilakukan uji *Post Hoc LSD* untuk melihat dosis mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.4 Rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo

Analisis perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok dengan Uji *One way anova* diperoleh hasil *p value* sebesar 0,036 ($p < 0,05$). Hasil menunjukkan adanya perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α yang bermakna antar kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* LSD untuk mengetahui dosis krim ekstrak daun sawo yang paling berpengaruh, ditunjukkan pada tabel 5.3 berikut:

Tabel 5.3 Hasil uji *Pos Hoc LSD* Ekspresi TNF- α tikus yang dipapar UV-B dengan pemberian krim ekstrak daun sawo

Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1(Kontrol)		0,276	0,016*	0,818
K2(Placebo)			0,144	0,191
K3(Dosis 25%)				0,009*

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

Hasil uji *Post Hoc LSD* menunjukkan bahwa perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok, pemberian krim ekstrak daun sawo dosis 50% (K4) menurunkan ekspresi TNF- α lebih rendah dibandingkan kelompok positif (K1) tanpa perlakuan maupun kelompok dengan perlakuan krim placebo, Namun pada kelompok pemberian krim ekstrak daun sawo dosis 25% tidak mengalami penurunan ekspresi TNF- α dengan hasil paling tinggi antar kelompok perlakuan.

4.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh pemberian krim ekstrak daun (*Manilkara zapota*) dalam memperbaiki kerusakan kulit akibat dermatoheliosis (*Sunburn*) yang disebabkan paparan UVB. Radiasi UV menginduksi sitokin proinflamasi seperti produksi TNF- α dan IL1 oleh

keratinosit, fibroblast dermal dan sel inflamasi lainnya. TNF- α merangsang pelepasan banyak sitokin dan kemokin.³⁷ Penelitian sebelumnya pada tikus dengan pemberian etanercept (TNF blocker, 4 mg/kg/hr) memblokir TNF α menghambat makrofag, sel mast, dan neutrophil yang diinduksi UVB. Kulit tikus yang disinari UVB mengandung kolagen yang lebih matang dibandingkan tikus yang diterapi dengan etanercept dan UVB+etanercept.³⁷ Dengan demikian penelitian ini mencoba berkontribusi dan memberikan alternatif dengan penggunaan antioksidan herbal alami berupa formulasi krim ekstrak daun sawo untuk memperbaiki kerusakan kulit akibat paparan sinar UVB.

Paparan UVB yang berlebihan menyebabkan kulit terbakar yang ditandai dengan keratinosit abnormal yang terjadi sebelum waktunya dan bervakuola yang dikenal sebagai sel kulit terbakar, spongiosis epidermal ringan, penipisan sel Langerhans, pembesaran sel endotel, dan infiltrasi dermal neutrofilik. Menginduksi sitokin proinflamasi termasuk IL-1 dan TNF- α pada kulit. TNF- α merangsang kemotaksis sel inflamasi pada kulit. Sel-sel ini mengeluarkan metalloproteinase (MMPs) dan enzim lain yang merusak matriks kulit.³⁷

Paparan kulit terhadap radiasi secara terus-menerus menyebabkan kerusakan kulit topikal dan menyebabkan respons inflamasi, sehingga mengakibatkan penuaan kulit dini, yang didefinisikan sebagai “photoaging”, yang ditandai dengan kerutan, kelemahan, kekeringan, kekasaran, dan pigmentasi.³⁸ Radiasi UVB dapat dengan cepat menginduksi ekspresi TNF- α

pada keratinosit (KCs), fibroblas dermal dan sel mast, menyebabkan kaskade inflamasi pada kulit.³⁷

Pada penelitian ini menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α dengan pemberian krim ekstrak daun sawo dosis 50% dibandingkan dengan kelompok positif maupun kelompok krim placebo. Ekstrak daun *Manilkara zapota* memiliki aktivitas anti inflamasi sehingga menghambat pelepasan TNF- α yang menekan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan. Pada dosis krim ekstrak daun sawo 25% tidak mengalami penurunan ekspresi TNF- α , kandungan antioksidan pada sediaan masih lebih kecil dari radikal bebas sehingga tidak dapat meredam ekspresi TNF- α , tren peningkatan diduga akibat respon imun, tingginya tingkat apoptosis sel pada lingkungan inflamasi. Selain itu tidak dilakukannya pemeriksaan pre test ekspresi TNF- α sehingga tidak dapat membedakan ekspresi TNF- α sebelum dan sesudah perlakuan.

Pengikatan menghasilkan perekrutan beberapa faktor termasuk TRADD, RIP1, TRAF2, dan cIAP 1 dan 2 yang menghasilkan pembentukan kompleks I yang memberi sinyal melalui jalur NF- κ B atau MAPK untuk mengaktifkan p65 atau AP1. Pensinyalan kompleks I menghasilkan transkripsi gen inflamasi (kemokin, sitokin) dan matriks katabolik (MMPs, ADAMTSs) serta gen pro-survival (cIAP1 dan 2, cFLIP, TRAF1, TRAF2). Mekanisme TNFR1 yang terikat pada sTNF- α dapat diinternalisasi dan memulai pembentukan Kompleks II atau DISC yang menyebabkan pembelahan procaspase 8 dan akhirnya apoptosis sel.³⁹

Kematian sel yang disebabkan oleh cedera menyebabkan pelepasan IL-1 α yang memberi sinyal melalui IL-1R untuk menginduksi respons inflamasi. IL-1R diekspresikan secara konstitutif oleh berbagai jenis sel dan aktivasi NF- κ B dan MAPK di bagian hilir IL-1R menginduksi produksi mediator proinflamasi seperti siklooksigenase tipe-2 (COX-2), IL-6, TNF- α . TNF yang selanjutnya meningkatkan produksi IL-1 α and IL-1 β , memperkuat rangsangan inflamasi yang diberikan oleh pelepasan awal IL-1 α .⁴⁰

Radiasi UVB mengaktifkan sinyal MAPK seperti ERK1, JNK dan p38, meningkatkan penanda inflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan COX-2.⁴¹ Paparan UVB berlebih mengganggu fungsi penghalang epidermal pada tikus dengan cara yang bergantung pada dosis yang menyebabkan respon inflamasi akut atau eksaserbasi penyakit kulit inflamasi kronis. Sumber sitokin yang dominan pada epidermis adalah keratinosit dan sebagian besar sitokin yang disekresikan dari keratinosit pada penyinaran UVR adalah Interleukin (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-33). Keratinosit yang rusak akibat sinar UV mengeluarkan RNA nonkode yang dapat mengaktifkan TLR3 dan menginduksi respons inflamasi, seperti peningkatan IL-1.⁴¹

Hasil pemeriksaan ekspresi IL-1 tidak terjadi perubahan signifikan dikarenakan stimulasi transkripsi IL-1 terjadi dalam waktu 30 menit, dan dapat dipertahankan selama berjam-jam.⁴³ IL-1 berperan dalam menentukan nasib sel sehubungan dengan modulasi jalur apoptosis, proliferasi dan diferensiasi sel.⁴⁴ Setelah paparan UV, keratinosit mengeluarkan peningkatan kadar protein keluarga IL-1 teraktivasi yang bergantung pada aktivasi

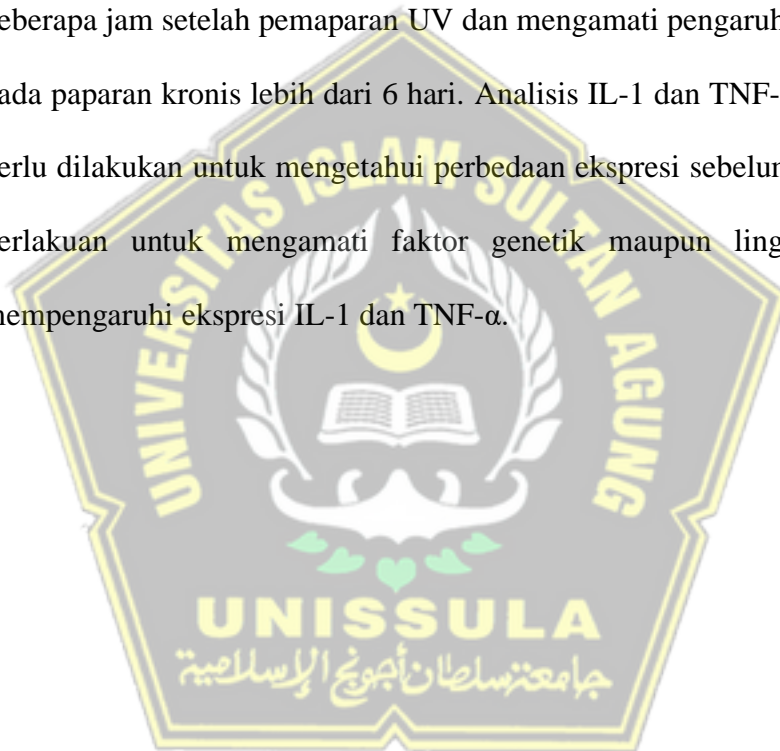
inflamasi.⁴² Namun pada kulit tikus, produksi IL-1 tidak dapat dideteksi pada keratinosit setelah paparan UVR atau rangsangan inflamasi lainnya.⁴³

Secara umum, IL-1 tidak dapat dideteksi atau diekspresikan dalam bentuk pro pada tingkat yang sangat rendah, pada jaringan dan sel istirahat. Sekresi bentuk aktifnya dapat diinduksi dalam berbagai macam sel termasuk keratinosit manusia (tetapi bukan tikus) dan subset sel myeloid (makrofag, monosit, dan sel dendritik) sebagai respons terhadap infeksi, cedera fisik, atau kerusakan akibat sinar matahari.⁴⁴ Kerusakan keratinosit akibat sinar matahari yang tidak dapat dipulihkan, akan menjalani apoptosis untuk menghilangkan sel-sel yang rusak atau bermutasi. Apoptosis yang diinduksi UVR dapat dipicu oleh pembentukan ROS atau aktivasi reseptor CD95. Namun, peningkatan regulasi CD95 saja tidak memperhitungkan apoptosis yang diinduksi oleh sinar UV, yang menunjukkan adanya faktor lain yang terlibat. Penelitian *in vitro* pada keratinosit yang dikultur menunjukkan bahwa IL-1 dapat melindungi terhadap apoptosis yang dimediasi TNF- α dan CD95, namun tidak terhadap kematian sel akibat sinar UV.⁴³

Paparan UV lebih lama dengan dosis yang lebih besar perlu dilakukan. Lama paparan UV semakin meningkatkan kadar IL-1, pelepasan IL-1 α dari sel-sel yang mati merupakan pendorong utama banyak proses inflamasi. IL-1 α disebut sebagai “alarmin” dan pola molekul terkait bahaya kritis (DAMP) selama cedera steril.⁴⁰ Jalur TNF- α di kompleks I yang bertugas memperbaiki kerusakan sel lebih cepat, sedangkan pada kompleks II dimana apoptosis sel terjadi, IL-1 berperan pada kondisi inflamasi, IL-1 bertahan selama proses

apoptosis sehingga sering dideteksi ekspresi IL-1 yang tinggi pada kondisi peradangan kronis.

Penelitian ini membuktikan formulasi krim ekstrak daun *Manilkara zapota* mempengaruhi ekspresi TNF- α dan tidak mempengaruhi IL-1 pada model tikus yang mengalami *sunburn*. Namun, penelitian masih perlu dilanjutkan pada model hewan terpapar UVB di tahap awal aktivasi IL-1 beberapa jam setelah pemaparan UV dan mengamati pengaruh ekspresi IL-1 pada paparan kronis lebih dari 6 hari. Analisis IL-1 dan TNF- α pre test juga perlu dilakukan untuk mengetahui perbedaan ekspresi sebelum dan sesudah perlakuan untuk mengamati faktor genetik maupun lingkungan yang mempengaruhi ekspresi IL-1 dan TNF- α .



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

6.1.1 Pemberian krim ekstrak daun (*Manilkara zapota*) tidak berpengaruh terhadap ekspresi IL-1 pada tikus wistar yang diinduksi UVB

6.1.2 Pemberian krim ekstrak daun (*Manilkara zapota*) berpengaruh terhadap ekspresi TNF- α pada tikus wistar yang diinduksi UVB

6.2. Saran

5.2.1. Perlunya penelitian berikutnya dengan model tikus pada tahap awal aktivasi IL-1, beberapa jam setelah paparan UV-B dan mengamati pengaruh ekspresi IL-1 pada paparan kronis lebih dari 6 hari.

5.2.2. Melakukan analisis IL-1 dan TNF- α pre test untuk mengamati perbedaan hasil dan faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil ekspresi IL-1 dan TNF- α .

DAFTAR PUSTAKA

1. Alfredsson L, Armstrong BK, Allan Butterfield D, et al. Insufficient sun exposure has become a real public health problem. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(14):1-15. doi:10.3390/ijerph17145014
2. *Katsubo : Bizu Rabi. 2012-Haru*. Entaburein; 2012.
3. Xiao T, Yan Z, Xiao S, Xia Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-020-01755-y
4. Islam S, Alam MB, Ann HJ, Park JH, Lee SH, Kim S. Metabolite profiling of manilkara zapota l. Leaves by high-resolution mass spectrometry coupled with esi and apci and in vitro antioxidant activity, α -glucosidase, and elastase inhibition assays. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1-17. doi:10.3390/ijms22010132
5. Ramos A, Alvarez MR, Delica K, et al. Antioxidant and Anticancer Activities of Manilkara zapota and Lansium domesticum Leaves Coupled with Metabolomics analysis using Molecular Networking. *Vietnam Journal of Chemistry*. 2022;60(5):578-588. doi:10.1002/vjch.202100110
6. Mohd Tamsir N, Mohd Esa N, Omar SNC, Shafie NH. Manilkara zapota (L.) P. Royen: Potential source of natural antioxidants. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2020;16(8):196-204.
7. Alsareii SA, Alzerwi NAN, Alasmari MY, et al. Manilkara zapota L. extract topical ointment application to skin wounds in rats speeds up the healing process. *Front Pharmacol*. 2023;14(June):1-15. doi:10.3389/fphar.2023.1206438
8. Sabido PWME. Photoprotection: Review and updates. *J Phil Dermatol Soc*. Published online 2017:11-17.
9. Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*. 2010;34(3). doi:10.1016/j.jaut.2009.11.011
10. Chen X, Yang C, Jiang G. Research progress on skin photoaging and oxidative stress. *Postepy Dermatol Alergol*. 2021;38(6):931-936. doi:10.5114/ada.2021.112275
11. Respati RA, Yusharyahya SN, Wibawa LP, Widaty S. The Dermoscopic Features of Photoaging and Its Association with Sun Index Score in the Coastal Population at Cilincing, Jakarta: A Cross-Sectional Study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2022;Volume 15:939-946. doi:10.2147/CCID.S355260
12. 9. jacob.
13. Chen X, Yang C, Jiang G. Research progress on skin photoaging and oxidative stress. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2021;38(6):931-936. doi:10.5114/ada.2021.112275

14. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants*. 2015;4(2):248-268. doi:10.3390/antiox4020248
15. Ciałyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet radiation and chronic inflammation-molecules and mechanisms involved in skin carcinogenesis: A narrative review. *Life*. 2021;11(4). doi:10.3390/life11040326
16. Langton AK, Ayer J, Griffiths TW, et al. Distinctive clinical and histological characteristics of atrophic and hypertrophic facial photoageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2021;35(3):762-768. doi:10.1111/jdv.17063
17. Sachs DL, Varani J, Chubb H, et al. Atrophic and hypertrophic photoaging: Clinical, histologic, and molecular features of 2 distinct phenotypes of photoaged skin. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(2):480-488. doi:10.1016/j.jaad.2019.03.081
18. Mescher AL. *Janquiera's Basic Histology*.; 2021.
19. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*. 2019;39(1):12. doi:10.1186/s41232-019-0101-5
20. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev*. 2018;281(1):57-61. doi:10.1111/imr.12614
21. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
22. Justiz Vaillant AA, Qurie A. *Interleukin*. StatPearls [Internet]; 2022.
23. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF- α production in the skin. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):87-91. doi:10.1007/S00403-008-0893-7/FIGURES/4
24. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol 22, Page 2719*. 2021;22(5):2719. doi:10.3390/IJMS22052719
25. Islam S, Alam MB, Ann HJ, Park JH, Lee SH, Kim S. Metabolite Profiling of Manilkara zapota L. Leaves by High-Resolution Mass Spectrometry Coupled with ESI and APCI and In Vitro Antioxidant Activity, α -Glucosidase, and Elastase Inhibition Assays. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):132. doi:10.3390/ijms22010132
26. Ansari SF, Khan A ullah, Qazi NG, Shah FA, Naeem K. In Vivo, Proteomic, and In Silico Investigation of Sapodilla for

- Therapeutic Potential in Gastrointestinal Disorders. *Biomed Res Int.* 2019;2019:1-19. doi:10.1155/2019/4921086
27. Riaz MB, Khan A ullah, Qazi NG. Pharmacological and computational evaluation of Sapodilla and its constituents for therapeutic potential in hyperactive gastrointestinal disorders. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(2):224-235.
 28. Freitas TS, Campina FF, Costa MS, et al. UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the Manilkara zapota (L.) P. Royen against Escherichia coli and other MDR bacteria. *Cell Mol Biol.* 2021;67(1):116-124. doi:10.14715/cmb/2021.67.1.18
 29. Hernández-Bolio, Dzul-Romero, Velázquez, Cresencio, Hernández-Núñez, Aguirre-Crespo. The Influence of Drying Temperatures on the Metabolic Profiles and Antioxidant Activity of Manilkara zapota Leaves. *Metabolites.* 2019;9(10):217. doi:10.3390/metabo9100217
 30. Ganguly A, Mahmud Z Al, Uddin MMN, Rahman SMA. In-vivo anti-inflammatory and anti-pyretic activities of Manilkara zapota leaves in albino Wistar rats. *Asian Pac J Trop Dis.* 2013;3(4):301-307. doi:10.1016/S2222-1808(13)60073-0
 31. Ijaz M, Fatima M, Anwar R, Uroos M. Green synthesis of gold nanoparticles from: Manilkara zapota L. extract and the evaluation of its intrinsic in vivo antiarthritic potential. *RSC Adv.* 2021;11(44):27092-27106. doi:10.1039/d1ra03186d
 32. Ganguly A, Mahmud Z Al, Uddin MMN, Rahman SA. In-vivo anti-inflammatory and anti-pyretic activities of Manilkara zapota leaves in albino Wistar rats. *Asian Pac J Trop Dis.* 2013;3(4):301-307. doi:10.1016/S2222-1808(13)60073-0
 33. Čoma M, Fröhlichová L, Urban L, et al. Molecular Changes Underlying Hypertrophic Scarring Following Burns Involve Specific Deregulations at All Wound Healing Stages (Inflammation, Proliferation and Maturation). *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):897. doi:10.3390/ijms22020897
 34. Xu P, Wu Y, Zhou L, et al. Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing by promoting re-epithelialization. *Burns Trauma.* 2020;8. doi:10.1093/burnst/tkaa028
 35. Hu Y, Liang D, Li X, et al. The Role of Interleukin-1 in Wound Biology. Part II. *Anesth Analg.* 2010;111(6):1534-1542. doi:10.1213/ANE.0b013e3181f691eb
 36. Puspitasari AD, Yuita NE, Sumantri S. KRIM ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN KOPI ARABIKA (Coffea Arabica). *Jurnal Ilmiah Teknosains.* 2017;3(2). doi:10.26877/jitek.v3i2.1884
 37. Sharma MR, Mitrani R, Werth VP. Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice. *J Photochem Photobiol B.* 2020;213. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112072

38. Chiu HW, Chen CH, Chen YJ, Hsu YH. Far-infrared suppresses skin photoaging in ultraviolet B-exposed fibroblasts and hairless mice. *PLoS One*. 2017;12(3). doi:10.1371/journal.pone.0174042
39. Lee KJ, Park KH, Hahn JH. Alleviation of ultraviolet-B radiation-induced photoaging by a TNFR antagonistic peptide, TNFR2-SKE. *Mol Cells*. 2019;42(2):151-160. doi:10.14348/molcells.2018.0423
40. Malik A, Kanneganti TD. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. *Immunol Rev*. 2018;281(1):124-137. doi:10.1111/imr.12615
41. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
42. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105). doi:10.1126/scisignal.3105cm1
43. Nasti TH, Timares L. Inflammasome activation of IL-1 family mediators in response to cutaneous photodamage. In: *Photochemistry and Photobiology*. Vol 88. ; 2012:1111-1125. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01182.x
44. Shah H, Rawal Mahajan S. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomedicine and Aging Pathology*. 2013;3(3):161-169. doi:10.1016/j.biomag.2013.05.003

