

**PENGARUH KRIM EKSTRAK TAPAK DORO (*Catharanthus roseus*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β) DAN MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (MMP-3)
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

**Ivana Uji Anna Dyan Cholil
MBK.23.21.010357**

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

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH KRIM EKSTRAK TAPAK DORO (*Catharanthus roseus*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β) DAN MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (MMP-3)

(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)

Disusun oleh :

Ivana Uji Anna Dyan Cholil

MBK. 23.21.010357

Akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 27 Mei 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,

Pembimbing II,


Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, Mkes

NIK. 220198045


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

NIK. 210199050

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung

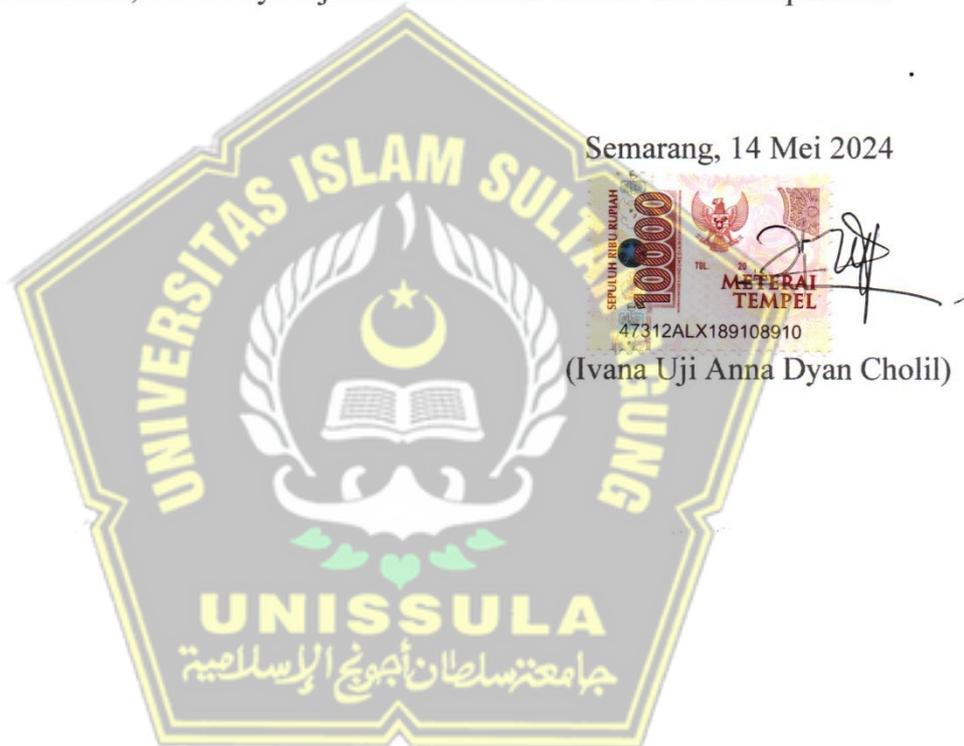

Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med

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, 14 Mei 2024



(Ivana Uji Anna Dyan Cholil)



KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH KRIM EKSTRAK TAPAK DORO (*Catharanthus roseus*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β) DAN MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (MMP-3) (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UV-B)**. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

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

4. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati. Mkes selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M. Kes, selaku penguji I yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk mereview dan memberikan masukan dalam pembuatan tesis ini.
6. Dr. H. Israhanto Isradji, M.Si, selaku penguji II yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk mereview dan memberikan masukan dalam pembuatan tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E. FINSADV, FAADV, selaku penguji III yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk mereview dan memberikan masukan dalam pembuatan tesis ini.
8. 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.
9. Orang tua tercinta, Bapak H. Ir. Dyan Cholil dan Ibu Hj. Dra. Ulwiyah Syahri yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa, sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.
10. Suami dan anak tercinta, Bagus Joko Raharjo B. Eng., Nara Agastya Khansa Raharjo, Hanania Maheswari Raharjo yang selalu memberikan dukungan,

semangat dan doa, sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.

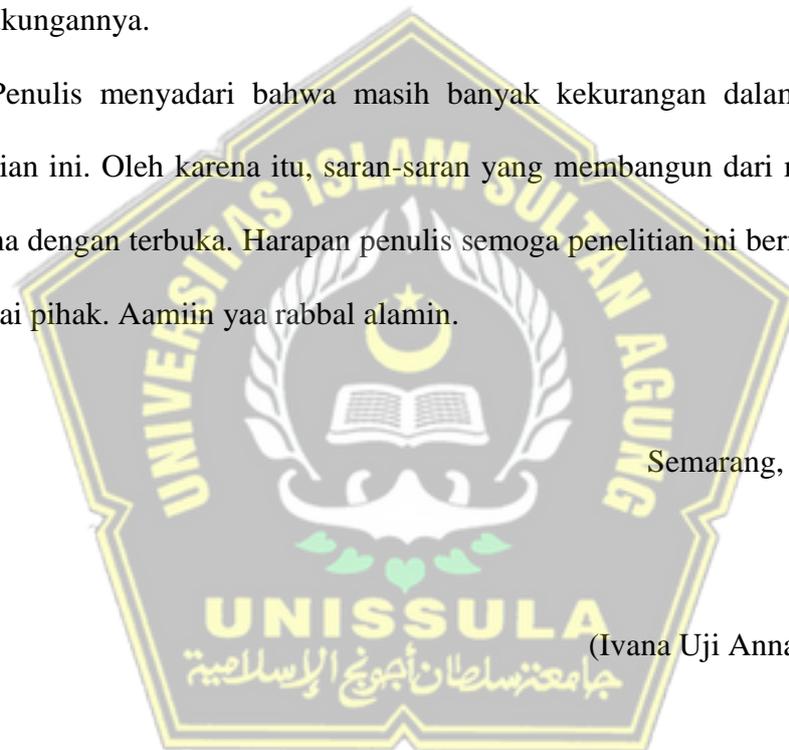
11. Mas Ardi, Mas Adam, Mba Zia, drh. Oky, dr. Wahyu serta tim laboratorium SCCR lainnya yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian tesis ini.

12. 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. Aamiin yaa rabbal alamin.

Semarang, Mei 2024

(Ivana Uji Anna Dyan Cholil)



ABSTRAK

Latar belakang: Paparan sinar UVB menyebabkan kerusakan struktur kulit, memicu peradangan yang berujung penurunan kolagen. Krim Ekstrak Tapak Doro mengandung bahan aktif flavonoid, terpenoid dan tanin yang bersifat antiinflamasi dan antioksidan sehingga memiliki potensi menekan degradasi kolagen kulit. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh pemberian krim Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus model kehilangan kolagen.

Metode: Desain *post test only control group*. Dibagi 5 kelompok: K1 (tikus sehat), K2 (tikus terpapar UVB dengan krim dasar), K3 (tikus terpapar UVB dengan krim vitamin E), K4 (tikus terpapar UVB dengan krim Ekstrak Tapak Doro 10%), dan K5 (tikus terpapar UVB dengan krim Ekstrak Tapak Doro 20%). Tikus dikenai paparan UVB 1MED selama 8 menit sebanyak 10 kali dalam 2 minggu. Perlakuan diberikan setiap hari selama 14 hari, dan tikus diistirahatkan 24 jam setelah perlakuan terakhir. Kadar IL-1 β dan MMP-3 dianalisis menggunakan metode ELISA. Uji statistik deskriptif diikuti dengan uji normalitas dan homogenitas, dan uji beda menggunakan One-Way ANOVA.

Hasil: Kadar IL-1 β pada K1 (162,8 \pm 74pg/ml), K2 (1215 \pm 178pg/mL), K3 (916 \pm 134 pg/mL), K4 (627 \pm 44pg/mL), K5 (551 \pm 130pg/mL). Analisis K4 dan K5 lebih rendah secara signifikan dibanding K3 dan K2 ($p < 0,05$), namun lebih tinggi secara signifikan dibanding K1 ($p < 0,05$). Kadar MMP-3 pada K1 (760 \pm 312pg/ml), K2 (7883 \pm 780pg/mL), K3 (5743 \pm 600pg/mL), K4 (4328 \pm 308pg/mL), K5 (3464 \pm 684pg/mL). Analisis K4 dan K5 lebih rendah secara signifikan dibanding K3 dan K2 ($p < 0,05$) namun lebih tinggi secara signifikan dibanding K1 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Terdapat perbedaan kadar IL-1 β dan MMP-3 pada tikus model kehilangan kolagen setelah pemberian krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20%.

Kata kunci: UVB, Ekstrak Tapak Doro, IL-1 β , MMP-3

ABSTRACT

Background: Exposure to UVB rays causes damage to skin structure, triggering inflammation which leads to a decrease in collagen. Tapak Doro Extract Cream contains the active ingredients flavonoids, terpenoids and tannins which have anti-inflammatory and antioxidant properties so they have the potential to suppress skin collagen degradation. The research aims to determine the effect of administering Tapak Doro Extract cream on IL-1 β and MMP-3 levels in mice with a collagen loss model.

Method: Post test only control group design. Divided into 5 groups: K1 (healthy rats), K2 (rats exposed to UVB with base cream), K3 (rats exposed to UVB with vitamin E cream), K4 (rats exposed to UVB with 10% Doro Tapak Extract cream), and K5 (rats exposed UVB with Doro Tapak Extract cream 20%). Mice were exposed to UVB IMED for 8 minutes 10 times in 2 weeks. Treatment was given every day for 14 days, and the mice were rested 24 hours after the last treatment. IL-1 β and MMP-3 levels were analyzed using the ELISA method. Descriptive statistical analysis is followed by tests for normality, homogeneity, and differences using One-Way ANOVA.

Results: IL-1 β levels in K1 (162.8 \pm 74pg/mL), K2 (1215 \pm 178pg/mL), K3 (916 \pm 134 pg/mL), K4 (627 \pm 44pg/mL), K5 (551 \pm 130pg/mL). Analysis of K4 and K5 was significantly lower than K3 and K2 (p <0.05), but significantly higher than K1 (p <0.05). MMP-3 levels in K1 (760 \pm 312pg/mL), K2 (7883 \pm 780pg/mL), K3 (5743 \pm 600pg/mL), K4 (4328 \pm 308pg/mL), K5 (3464 \pm 684pg/mL). Analysis of K4 and K5 was significantly lower than K3 and K2 (p <0.05) but significantly higher than K1 (p <0.05).

Conclusion: There are differences in IL-1 β and MMP-3 levels in collagen loss model mice after administration of 10% and 20% Tapak Doro Extract cream.

Key words: UVB, Tapak Doro Extract, IL-1 β , MMP-3

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan umum.....	3
1.3.2. Tujuan khusus.....	3
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Interleukin 1 (IL-1).....	7
2.1.1. Definisi.....	7
2.1.2. Jenis Interleukin 1.....	7
2.1.3. Jalur Aktivasi IL-1 β	8
2.1.4. Peran IL-1 β pada <i>Collagen loss</i> Akibat Paparan UVB.....	9
2.2. Matrixmetalloproteinase 3 (MMP-3).....	11

2.2.1. Definisi.....	11
2.2.2. Struktur dan aktivitas MMP-3.....	11
2.2.3. Peran MMP-3 dalam <i>Collagen loss</i> Akibat Paparan UVB	12
2.3. Tapak Doro (<i>Catharanthus roseus</i>).....	14
2.3.1. Biologi Tapak Doro	14
2.3.2. Manfaat Tapak Doro.....	15
2.4. Peran Paparan UVB dalam <i>Collagen loss</i>	16
2.5. Tikus Wistar	18
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	20
3.1 Kerangka Teori.....	20
3.2 Kerangka konsep.....	24
3.3 Hipotesis	24
BAB IV METODE PENELITIAN	25
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	25
4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional	26
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	29
4.4. Besar Sampel	29
4.5. Alat dan Bahan.....	30
4.6. Cara Penelitian	32
4.7. Langkah Penelitian.....	37
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian.....	40
4.9. Analisa Data.....	40
4.10 Alur Penelitian	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1. Hasil Penelitian	43
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	53
6.1. Kesimpulan	53
6.2. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase-2 Inhibitor</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DAMP	: <i>Damage Associate Molecular Pattern</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated</i>
H ₂ O ₂	: Hidrogen peroksida
IL	: <i>Interleukin</i>
IκBα	: <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
JNK	: <i>C-Jun NH₂-terminal kinase</i>
Keap1	: <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kDA	: Kilo Dalton
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	: <i>Nitrit oxide</i>
OH	: <i>Hydroxide</i>
PAMP	: <i>Pathogen Associate Molecular Pattern</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMPS	: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRPV	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
UVA	: <i>Ultraviolet A</i>

UVB : Ultraviolet B

UVC : Ultraviolet C



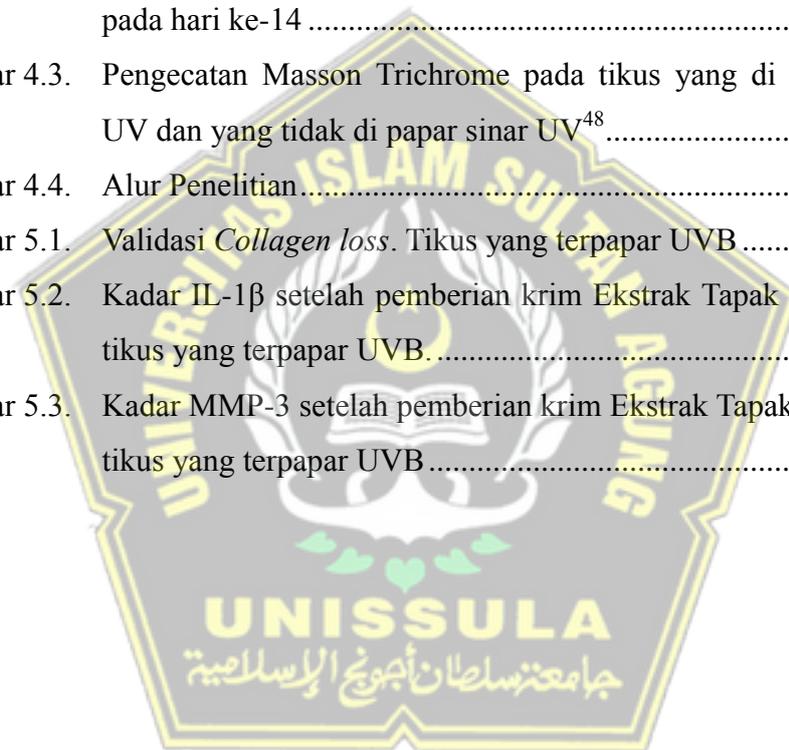
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 5.1. Profil Fitokimia Ekstrak Tapak Doro	44
Tabel 5.2. Data Hasil Analisis Kadar IL-1 β dan MMP-3.....	47
Tabel 5.3. Uji Post hoc LSD kadar IL-1 β	49
Tabel 5.4. Uji Post hoc LSD Kadar MMP-3	49



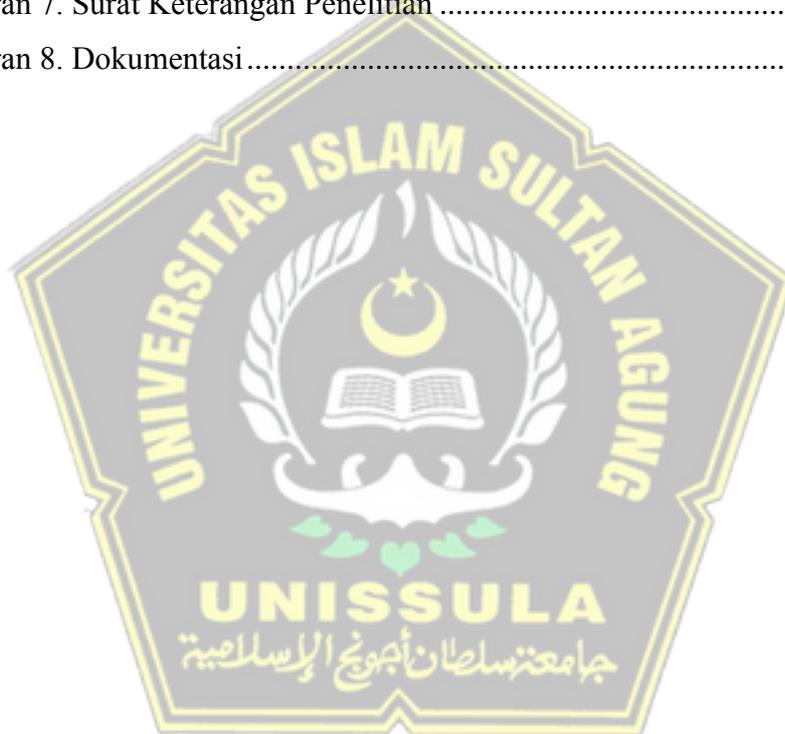
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Morfologi Tapak Doro.....	15
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	23
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	24
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian	25
Gambar 4.2.	Validasi hewan coba kerutan akibat <i>collagen loss</i> pada tikus yang di papar sinar UVB dan yang tidak di papar sinar UVB pada hari ke-14	35
Gambar 4.3.	Pengecatan Masson Trichrome pada tikus yang di papar sinar UV dan yang tidak di papar sinar UV ⁴⁸	37
Gambar 4.4.	Alur Penelitian.....	42
Gambar 5.1.	Validasi <i>Collagen loss</i> . Tikus yang terpapar UVB	45
Gambar 5.2.	Kadar IL-1 β setelah pemberian krim Ekstrak Tapak Doro pada tikus yang terpapar UVB.....	49
Gambar 5.3.	Kadar MMP-3 setelah pemberian krim Ekstrak Tapak Doro pada tikus yang terpapar UVB	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Etichal Clearace</i>	60
Lampiran 2. Analisis Statistik	61
Lampiran 3. Raw Data ELISA	65
Lampiran 4. Skrining Fitokimia	69
Lampiran 5. Analisis Kandungan TPC dan TFC.....	70
Lampiran 6. Surat Hasil Analisis Lab	71
Lampiran 7. Surat Keterangan Penelitian	73
Lampiran 8. Dokumentasi	74



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Collagen loss merupakan kondisi berkurangnya densitas kolagen pada kulit manusia yang dapat menyebabkan penurunan elastisitas dan kekencangan kulit serta munculnya kerutan dan garis-garis halus.¹⁻³ Kondisi ini juga dapat mempengaruhi struktur dan tekstur kulit secara keseluruhan, sehingga menyebabkan penampilan kulit kusam dan kendur. Salah satu faktor yang menyebabkan kondisi ini adalah paparan sinar ultraviolet B (UVB).^{4,5} Radiasi UVB dapat mengakibatkan terjadinya respon inflamasi yang ditandai dengan peningkatan marker inflamasi, termasuk IL-1 β dan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan sekresi IL-1 β secara berkelanjutan akibat paparan UVB yang berlangsung dapat merangsang produksi enzim pendegradasi kolagen, termasuk matriks-3 metalloproteinase (MMP-3) oleh sel imun di sekitar area paparan UVB. Hal ini berdampak pada kondisi *collagen loss*. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa Tapak Doro (*Catharanthus roseus*) mengandung bahan aktif yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi, meskipun demikian peran Tapak Doro dalam menghambat IL-1 β dan MMP-3 pada *collagen loss* masih belum jelas.^{6,7}

Paparan sinar UV telah diidentifikasi sebagai faktor utama pada proses *collagen loss* yang telah menjadi masalah signifikan di seluruh dunia.^{4,8} Studi menunjukkan bahwa sinar UV dapat menyebabkan kerusakan pada serat kolagen dan elastin dalam kulit yang menyebabkan terjadinya keriput, garis halus, dan

kehilangan elastisitas kulit.^{3,9} Selain itu seiring perubahan pola hidup global, termasuk peningkatan aktivitas di luar ruangan dan penurunan penggunaan perlindungan matahari menyebabkan peningkatan kasus *collagen loss*. Di beberapa negara, terutama di daerah yang terpapar sinar UV tinggi, kehilangan kolagen menjadi masalah kesehatan kulit yang mendesak. Menurut penelitian terdahulu, 94% masyarakat berusia 40 tahun mengalami penurunan kolagen akibat paparan sinar matahari.¹⁰ Hal ini mendorong meningkatnya kesadaran akan perlunya melindungi kulit dari sinar UV dengan menggunakan tabir surya. Meskipun banyak upaya pencegahan dan pengobatan telah dilakukan menggunakan bahan kimia, namun penggunaan dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan berbagai penyakit, termasuk iritasi dan kanker.^{3,9}

Tapak Doro adalah tanaman tahunan dengan batang tegak, daun berlawanan, dan bunga berwarna merah muda atau ungu. Tanaman ini sering digunakan sebagai tanaman hias, termasuk dalam famili Apocynaceae dan dikenal memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi untuk pengobatan tradisional dalam mengatasi berbagai kondisi kesehatan seperti diabetes, kanker, dan malaria¹². Tapak Doro diketahui mengandung berbagai jenis flavonoid seperti kaempferol, kuersetin, kempferol-3-O-glukosida; terpenoid seperti vindolin, vindolinin, dan serpentin, serta tannin seperti ellagitannin dan proanthocyanidin.^{14,15} Flavonoid dalam Tapak Doro diketahui mampu menghambat jalur NF- κ B, yang mengatur produksi protein inflamasi termasuk IL-1 β . Selain itu terpenoid juga memiliki sifat antioksidan yang dapat meningkatkan ekspresi Nrf2 sehingga merangsang

produksi enzim antioksidan untuk menekan stres oksidatif. Tannin menghambat fungsi MAPK dan aktivasi AP-1 yang mengatur protein MMP-3.

Studi sebelumnya menunjukkan bahwa krim Ekstrak Tapak Doro 15% efektif dalam menyembuhkan luka.^{16,17} Namun, belum ada penelitian tentang perannya dalam mengurangi IL-1 β dan MMP-3 pada tikus model kehilangan kolagen. Oleh karena itu, studi ini bertujuan mengevaluasi pengaruh krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20% pada tikus Wistar jantan yang diinduksi sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian Krim Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Krim Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan kadar IL-1 β pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan Krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20% dibandingkan dengan kontrol positif.
- b. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan kadar MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan

Krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20% dibandingkan dengan kontrol positif.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat didapat dari penelitian ini adalah adanya hasil ilmiah peran Krim Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang mengalami *collagen loss* pasca diinduksi sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan bermanfaat bagi masyarakat mengenai kegunaan Tapak Doro untuk perlindungan kulit. Bagi praktisi kesehatan, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan Ekstrak Tapak Doro sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan bagi individu yang mengalami *collagen loss* akibat terpapar sinar UVB dengan intensitas tinggi.

1.5. Originalitas Penelitian

Berdasarkan review literatur mengenai penggunaan *Catharanthus roseus* sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan, beberapa studi terkait telah diidentifikasi dan akan ditampilkan dalam Tabel 1 :

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Nayak, B. S. Pinto & Pereira, Lexley M. ¹⁸	<i>Catharanthus roseus</i> flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats	<i>In vivo</i>	dosis 100 mg/kgBB Ekstrak Tapak Doro dapat mempercepat wound healing
2	Leni ¹⁹	<i>Ointment Formulation of Tapak Doro (Catharanthus roseus (L.) G. Don) Flower Ethanol Extract and its Activity in Burn-Healing</i>	<i>In vivo</i>	Kadar 15% krim ETD dapat mempercepat penyembuhan luka bakar
3	Ahmed, Munir. ⁷	<i>Inhibition of Inflammation Associated Corneal Neovascularization by Dalbergia sissoo and Catharanthus roseus Leaf Extracts in an Animal Model</i>	<i>In vivo</i>	Ekstrak Tapak Doro menekan sel-sel inflamasi
4	Fattepur ¹⁴	<i>Toxicological and pharmacological activity of ethanolic extracts of catharanthus roseus in experimental animals</i>	<i>In vivo</i>	Dosis 500 mg/kg BB secara oral mampu menekan inflamasi dan mengaktifkan Nrf2 dan aktivasi enzim antioksidan
5	Zhu, M. ¹⁵	<i>Vindoline Attenuates Osteoarthritis Progression Through Suppressing the NF-κB and ERK Pathways in Both Chondrocytes and Subchondral Osteoclasts</i>	<i>In vitro dan in vivo</i>	Vindolin yang terkandung dalam Tapak Doro dapat menekan Nf-kB dan berujung pada penurunan IL-1 β
6	Meena R. Sharma, Robert Mitrani, Victoria P. Werths ⁵	<i>Effect of TNFα blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice</i>	<i>In vivo</i>	Paparan UVB selama 5 hari mampu menyebabkan penurunan densitas kolagen

Berdasarkan studi literatur didapatkan bahwa Tapak Doro telah diteliti terdahulu untuk beberapa gangguan kesehatan yang berhubungan dengan inflamasi. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa Tapak Doro dosis 100 mg/kgBB dapat mempercepat penyembuhan luka dan krim dengan kandungan 15% Ekstrak Tapak Doro dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Penelitian ini mengungkapkan adanya peran Tapak Doro pada regenerasi jaringan kulit.

Penelitian lain pada *Inflammation Associated Corneal Neovascularization* dan Osteoarthritis, menemukan Ekstrak Tapak Doro dapat menekan aktivitas sel-sel inflamasi dengan menekan Nf-kB dan penurunan IL-1 β . Penelitian ini mengungkapkan bahwa Ekstrak Tapak Doro memiliki kemampuan antiinflamasi. Penelitian ini berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan, namun menjadi pandangan bahwa terdapat peran Ekstrak Tapak Doro dalam inflamasi.

Penelitian lain terhadap toksisitas dan potensi aktivitas antioksidan, menemukan bahwa Dosis 500 mg/kg BB secara oral mampu menekan inflamasi dan mengaktifkan Nrf2 dan aktivasi enzim antioksidan. Penelitian ini berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan, namun memberikan informasi bahwa Ekstrak Tapak Doro dapat menurunkan radikal bebas melalui aktivasi Nrf2.

Berbagai penelitian yang telah dijabarkan di atas telah mengkaji peran Ekstrak Tapak Doro dalam regenerasi, inflamasi, dan antioksidan. Penelitian-penelitian tersebut masih belum ada yang mengkaji peran Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 dalam *collagen loss*, sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin 1 (IL-1)

2.1.1. Definisi

Interleukin-1 (IL-1) adalah salah satu sitokin pro-inflamasi yang penting dalam respons imun tubuh. Dengan berat molekul sekitar 17 kDa, IL-1 memiliki rumus kimia $C_{93}H_{148}N_{24}O_{37}S$. Protein IL-1 merupakan bagian dari keluarga protein interleukin dan diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk makrofag dan sel dendritik, sebagai respons terhadap infeksi, cedera, atau stres jaringan. Fungsi utamanya adalah merangsang produksi sitokin lainnya, seperti IL-6 dan TNF- α , serta mengatur respons inflamasi dan sistem kekebalan tubuh secara umum.¹⁶

2.1.2. Jenis Interleukin 1

Interleukin 1 merupakan kelompok sitokin yang terdiri dari dua bentuk utama, yaitu IL-1 α dan IL-1 β . Kedua bentuk ini memiliki peran penting dalam mengatur respons imun dan peradangan dalam tubuh manusia. IL-1 α dan IL-1 β diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk sel makrofag dan sel dendritik, sebagai respons terhadap infeksi atau cedera. IL-1 α dikenal karena fungsinya sebagai mediator lokal yang terikat pada membran dan berperan dalam aktivasi sel endotel, serta merangsang produksi sitokin lainnya, seperti IL-6 dan TNF- α .¹⁷ Sementara IL-1 β , yang dilepaskan setelah pengolahan dari prekursor yang diinduksi, berkontribusi

pada peradangan sistemik dan meningkatkan migrasi sel-sel imun ke lokasi infeksi atau cedera.

2.1.3. Jalur Aktivasi IL-1 β

Interleukin-1 β yang memiliki peran kunci dalam regulasi respons inflamasi dan system imun, disekresikan oleh berbagai jenis sel, terutama sel imun seperti makrofag dan sel dendritic, serta beberapa jenis sel lain seperti sel epithelial dan fibroblas. Proses sekresi IL-1 β terutama dipicu dalam kondisi seperti kerusakan jaringan yang memicu terjadinya *Damage Associate Molecular Pattern* (DAMP), atau adanya infeksi pathogen yang dikenali sebagai *Pathogen Associate Molecular Pattern* (PAMP), di mana sistem imun perlu diaktifkan untuk melawan ancaman.¹⁸ Ketika patogen seperti bakteri atau virus masuk ke dalam tubuh, makrofag dan sel dendritik mengenali patogen tersebut menggunakan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) mereka. Pengenalan ini memicu jalur sinyal yang mengaktifkan gen IL-1 β dan memulai produksi prekursor IL-1 β .

Peran IL-1 β dalam respons imun sangat luas dan vital karena memiliki kemampuan dalam aktivasi dan rekrutmen leukosit ke jaringan rusak, meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada endotel vaskular yang memfasilitasi pergerakan sel imun ke jaringan rusak, serta merangsang sel-sel imun dan non-imun untuk memproduksi sitokin lain yang berkontribusi pada pembentukan respons inflamasi.¹⁹⁻²⁰ Lebih lanjut, IL-1 β berkontribusi pada demam sebagai respons terhadap infeksi dengan mempengaruhi hipotalamus untuk meningkatkan suhu tubuh, yang merupakan bagian dari

mekanisme pertahanan tubuh untuk menghambat pertumbuhan patogen. Namun, produksi berlebihan IL-1 β dapat menyebabkan kondisi inflamasi kronis dan penyakit autoimun, menandakan pentingnya regulasi ketat dalam sekresi dan aktivitas IL-1 β .

2.1.4. Peran IL-1 β pada *Collagen loss* Akibat Paparan UVB

Paparan sinar UVB terhadap kulit memicu serangkaian respons molekuler yang kompleks yang melibatkan IL-1 β sebagai peran kunci, khususnya dalam proses kerusakan dan penuaan kulit. Radiasi UVB dapat menembus lapisan epidermis kulit, menyebabkan kerusakan DNA langsung pada sel-sel kulit dan induksi stres oksidatif yang mengaktifkan jalur sinyal inflamasi. Dalam kondisi ini, sel-sel keratinosit dan makrofag pada kulit diaktifkan untuk menghasilkan dan melepaskan IL-1 β . Sitokin IL-1 β yang disekresikan berfungsi sebagai mediator penting dalam respons inflamasi dengan memicu *cascades* sinyal intraseluler yang mengarah pada ekspresi gen-gen proinflamasi dan prodegradatif, termasuk matrix metalloproteinases (MMP), seperti MMP-3. Protein MMP-3 merupakan enzim yang berperan dalam degradasi komponen matriks ekstraselular, seperti kolagen dan elastin, menyebabkan kerusakan struktural pada dermis dan manifestasi dari penuaan kulit.²¹ Mekanisme ini dimulai dari aktivasi jalur NF- κ B dan MAPK oleh IL-1 β , yang selanjutnya meningkatkan transkripsi dan aktivitas MMP-3.²² Dengan demikian, IL-1 β tidak hanya berperan dalam memediasi respons inflamasi akibat paparan UVB tetapi juga dalam perubahan struktural kulit yang terkait dengan penuaan, menunjukkan hubungan

langsung antara inflamasi, kerusakan DNA oleh UVB, sekresi IL-1 β , dan aktivasi jalur protein yang mengarah pada peningkatan aktivitas MMP-3.

Peran IL-1 β yang krusial dalam proses degradasi kolagen pasca paparan UVB menjadi penting untuk diintervensi. Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-1 β dapat dihambat oleh beberapa bahan aktif seperti flavonoid, terpenoid, dan tannin.²³ Flavonoid, tanin, dan terpenoid merupakan senyawa bioaktif yang ditemukan dalam berbagai tanaman dan telah terbukti memiliki potensi untuk menekan ekspresi IL-1 β . Mekanisme molekuler di balik kemampuan senyawa-senyawa ini untuk menekan IL-1 β melibatkan modulasi jalur sinyal NF- κ B, faktor transkripsi utama dalam produksi ekspresi gen IL-1. Flavonoid, seperti quercetin dan kaempferol, dapat menghambat fosforilasi dan degradasi *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha* (I κ B α) yang merupakan inhibitor NF- κ B sehingga mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus dan berujung pada penghentian proses transkripsi gen IL-1 β .²⁴ Tanin, dengan struktur polifenoliknya yang kompleks, juga menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dengan cara yang serupa, menghambat jalur NF- κ B dan dengan demikian menurunkan ekspresi IL-1 β .²⁵ Terpenoid, termasuk β -caryophyllene, dapat berinteraksi langsung dengan protein sinyal yang terlibat dalam jalur NF- κ B. Terpenoid dikenal meregulasi jalur sinyal inflamasi melalui interaksi dengan reseptor seluler kanal ion, yang dapat mengubah respons seluler terhadap rangsangan inflamasi. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa terpenoid dapat modulasi aktivitas reseptor

Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV), yang berperan dalam regulasi nyeri dan inflamasi.

2.2. Matrixmetalloproteinase 3 (MMP-3)

2.2.1. Definisi

Matrix metalloproteinase-3, juga dikenal sebagai stromelysin-1, merupakan anggota dari keluarga besar proteinase zinc-dependent yang dikenal sebagai matrix metalloproteinases. Protein MMP-3 memiliki berat molekul sekitar 54 kDa dan berperan penting dalam degradasi berbagai jenis matriks ekstraseluler seperti proteoglikan, fibronectin, laminin, dan collagen, yang berperan dalam proses remodeling jaringan serta perbaikan dan *remodelling* jaringan.²⁶ Gen yang bertanggung jawab atas transkripsi MMP-3 adalah MMP3, yang terletak pada kromosom 11q22.3.

2.2.2. Struktur dan aktivitas MMP-3

Struktur dan aktivitas MMP-3 diatur secara ketat pada level transkripsi, aktivasi proenzim, dan inhibisi oleh *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), menunjukkan kompleksitas regulasi dan pentingnya MMP-3 dalam fisiologi dan patologi.²⁶ MMP-3 tidak hanya terlibat dalam proses fisiologis normal seperti perkembangan embrio, ovulasi, dan regenerasi jaringan, tetapi juga dalam kondisi patologis termasuk artritis, fibrosis, dan kanker.²⁷ Karena kemampuannya untuk mendegradasi berbagai komponen matriks ekstraseluler dan mengaktifkan MMP lain, MMP-3 memainkan peran kunci dalam cascades proteolitik yang memfasilitasi perubahan struktural jaringan.

2.2.3. Peran MMP-3 dalam *Collagen loss* Akibat Paparan UVB

Paparan radiasi ultraviolet B terhadap kulit memicu serangkaian reaksi molekular yang kompleks, termasuk aktivasi jalur inflamasi yang signifikan melalui faktor transkripsi NF- κ B. Faktor transkripsi NF- κ B berperan penting dalam respons inflamasi dengan mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi sitokin pro-inflamasi, kemokin, dan adhesi molekul. Aktivasi NF- κ B oleh UVB menyebabkan translokasi NF- κ B dari sitoplasma ke nucleus untuk memulai proses transkripsi gen-gen target, termasuk gen MMP-3. Hal ini mengarah pada degradasi matriks ekstraseluler, yang merupakan mekanisme kunci di balik kerusakan kulit seperti keriput dan kehilangan elastisitas yang diinduksi oleh paparan sinar matahari.

Selain itu, paparan UVB memicu aktivasi jalur radikal bebas melalui enzim NADPH Oxidase, yang berperan dalam produksi ROS.²⁷ Pembentukan ROS ini tidak hanya merusak komponen seluler melalui peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan oksidasi protein, tetapi juga memicu jalur sinyal yang mengarah pada ekspresi MMP-3.²⁸ ROS berperan dalam aktivasi NF- κ B, sehingga menghubungkan jalur radikal bebas dengan jalur inflamasi. Karena itu, enzim NADPH Oxidase merupakan komponen kunci dalam respons kulit terhadap stress oksidatif yang diinduksi UVB, berkontribusi pada kerusakan struktural dan fungsional kulit.

Paparan UVB juga meningkatkan rekrutment sel imun, khususnya Makrofag tipe 1, ke area kulit yang terpapar.²⁹ Makrofag tipe 1, yang diaktifkan oleh sitokin pro-inflamasi dan kemokin yang diproduksi sebagai

respons terhadap kerusakan yang diinduksi UVB, berperan dalam fagositosis dan eliminasi patogen serta debris seluler.⁵ Namun, aktivasi makrofag ini juga menyebabkan produksi lebih lanjut dari berbagai mediator inflamasi, termasuk ROS dan nitric oxide (NO), yang meningkatkan ekspresi MMP-3.³⁰ Oleh karena itu, rekrutment dan aktivasi Makrofag tipe 1 tidak hanya penting untuk respons imun dan perbaikan jaringan tetapi juga berkontribusi pada kerusakan matriks ekstraseluler melalui produksi MMP-3.³⁰

Kandungan bioaktif seperti flavonoid, terpenoid, dan tanin telah menunjukkan potensi dalam menekan kadar MMP melalui berbagai mekanisme yang melibatkan regulasi jalur sinyal dan aktivitas enzim.³² Salah satu jalur sinyal yang penting adalah jalur NF- κ B, yang terlibat dalam respons inflamasi dan ekspresi MMP-3. Flavonoid dan terpenoid telah terbukti menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga mengurangi ekspresi MMP-3 yang dipicu oleh sinyal inflamasi.

Selain itu, beberapa kandungan bioaktif seperti flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan *activator protein-1* (AP-1), dua jalur sinyal yang juga terlibat dalam regulasi ekspresi MMP-3. Dengan mengganggu jalur sinyal ini, flavonoid dan terpenoid dapat mengurangi respons pro-inflamasi yang memicu produksi MMP-3 oleh sel-sel kulit.

Tanin yang merupakan senyawa polifenol dapat berkontribusi dalam menekan kadar MMP-3 melalui regulasi aktivasi faktor transkripsi. Tanin dapat mengaktifkan jalur sinyal antioksidan dengan mengganggu interaksi

antara Nrf2 dan Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), sehingga meningkatkan ekspresi enzim antioksidan dan mengurangi stres oksidatif yang dapat merangsang produksi MMP-3.³³

Selain itu, beberapa kandungan bioaktif seperti flavonoid dan terpenoid juga memiliki aktivitas antioksidan secara langsung, yang dapat melindungi sel-sel kulit dari kerusakan oksidatif dengan mengurangi aktivasi enzim NADPH Oxidase (NOx) yang berperan dalam produksi radikal bebas. Penghambatan produksi radikal bebas dari senyawa bioaktif ini dapat secara tidak langsung mengurangi ekspresi MMP-3 yang dipicu oleh stres oksidatif.

2.3. Tapak Doro (*Catharanthus roseus*)

2.3.1. Biologi Tapak Doro

Tapak Doro (*Catharanthus roseus*) adalah tanaman yang sudah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional dan modern.³⁴ Tanaman yang termasuk dalam keluarga Apocynaceae ini berasal dari Madagaskar dan telah menyebar luas di berbagai wilayah tropis dan subtropis di seluruh dunia.³⁵ Tanaman Tapak Doro memiliki habitus semak yang rendah, biasanya tumbuh mencapai ketinggian sekitar 1 meter, meskipun beberapa varietas dapat tumbuh lebih tinggi tergantung pada kondisi lingkungan. Morfologi Tapak Doro ditandai oleh daun yang berbentuk elips, bertulang tunggal, dan bertumbuh berhadapan satu sama lain di sepanjang batang. Daunnya berwarna hijau gelap, berkilap, dan berukuran kecil hingga sedang. Bunga Tapak Doro bervariasi dalam warna, dari putih hingga merah muda, dan

memiliki bentuk yang khas dengan lima kelopak yang menyatu dan mahkota bunga yang mencuat (Gambar 2.1).³⁵



Gambar 2.1. Morfologi Tapak Doro

2.3.2. Manfaat Tapak Doro

Tapak Doro sering ditemukan di taman dan pekarangan rumah dengan area terbuka dan kondisi cahaya yang cukup. Meskipun tumbuh secara alami di habitat tropis dan subtropis, tanaman ini juga dapat berkembang dengan baik di berbagai lingkungan di seluruh dunia, terutama dalam kondisi iklim hangat hingga sedang.³⁶ Keindahan estetika bunga dan sifat obatnya membuat Tapak Doro menjadi tanaman hias populer di banyak negara, sementara sifat anti-kanker yang signifikan dari senyawa kimianya membuatnya menjadi fokus penelitian dalam bidang medis dan farmasi.³⁶

Tapak Doro diketahui mengandung berbagai jenis flavonoid seperti kaempferol, kuersetin, kempferol-3-O-glukosida; terpenoid seperti vindolin, vindolinin, dan serpentin, serta tannin seperti ellagitannin dan proanthocyanidin.^{34,37-40} Mereka bekerja melalui berbagai jalur molekuler dalam tubuh, termasuk penghambatan enzim pro-inflamasi seperti

cyclooxygenase (COX) dan lipoxigenase (LOX), yang terlibat dalam produksi mediator peradangan.⁴⁰ Selain itu, senyawa-senyawa ini juga dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen, SOD dan GPx, yang membantu melawan efek merusak dari radikal bebas. Dengan demikian, Tapak Doro menunjukkan potensi sebagai sumber bahan alami untuk pengembangan terapi antiinflamasi dan antioksidan yang efektif dalam mengatasi berbagai kondisi kesehatan.

2.4. Peran Paparan UVB dalam *Collagen loss*

Kehilangan kolagen akibat paparan sinar UVB merupakan permasalahan serius dalam kesehatan kulit manusia. UVB dapat memicu kerusakan kolagen melalui berbagai mekanisme, termasuk pembentukan ROS dan aktivasi jalur protein yang terlibat dalam degradasi kolagen. Ketika kulit terpapar UVB, sinar tersebut dapat merangsang produksi ROS melalui reaksi dengan NOx dalam kulit. ROS yang dihasilkan kemudian dapat memicu kerusakan DNA, perusakan membran sel, dan degradasi kolagen, yang pada gilirannya mengurangi kekencangan dan elastisitas kulit.^{2,3}

Selain itu, UVB juga dapat menghambat aktivitas faktor transkripsi Nrf2, yang bertanggung jawab atas regulasi gen-gen antioksidan dalam tubuh.⁴² Paparan sinar UVB telah terbukti menghambat fungsi aktivasi Nrf2 melalui beberapa mekanisme yang kompleks. Salah satu mekanisme utamanya adalah melalui kerusakan dan modifikasi pada protein-protein yang terlibat dalam jalur sinyal Nrf2. Misalnya, UVB dapat menyebabkan kerusakan pada protein keluarga reseptor aril hidrokarbon (AhR), yang

merupakan penganisiasi aktivasi Nrf2 dengan mengikat ligandnya. Namun, paparan UVB dapat mengganggu kemampuan AhR untuk berinteraksi dengan ligandnya, sehingga menghambat jalur sinyal yang mengarah pada aktivasi Nrf2.⁴³ Selain itu, UVB juga dapat mengakibatkan modifikasi pada protein adaptor seperti Keap1 yang bertanggung jawab atas regulasi Nrf2. Modifikasi ini dapat mengganggu interaksi antara Nrf2 dan Keap1, sehingga menghambat kemampuan Nrf2 untuk terlepas dari kompleks dengan Keap1 dan bertranslokasi ke inti sel untuk mengatur ekspresi gen-gen antioksidan.⁴⁴ Akibatnya, paparan UVB mengakibatkan penurunan aktivitas Nrf2 dan penurunan ekspresi gen-gen antioksidan, yang pada gilirannya meningkatkan kerentanan sel terhadap stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan kolagen serta integritas kulit.⁴⁴

Selain peran ROS, paparan UVB juga dapat memicu inflamasi dalam kulit melalui aktivasi jalur protein yang terlibat dalam respon inflamasi. UVB dapat menyebabkan kerusakan pada sel kulit, menghasilkan molekul yang dikenal sebagai DAMP, yang kemudian merangsang respons inflamasi melalui aktivasi reseptor tertentu pada sel-sel imun.⁴⁵ Aktivasi jalur protein seperti P53, sitokrom C, dan caspase 3 juga dapat terjadi sebagai respons terhadap kerusakan DNA dan apoptosis sel yang diinduksi oleh UVB, yang pada akhirnya dapat menyebabkan kehilangan kolagen dan kerusakan struktural pada kulit.⁴⁴

2.5. Tikus Wistar

Tikus Wistar adalah salah satu jenis tikus yang paling banyak digunakan dalam penelitian laboratorium. Namanya berasal dari Institut Wistar di Philadelphia, tempat pertama kali dibiakkan. Tikus galur ini sangat cocok untuk berbagai jenis penelitian karena sifat reproduksi yang efisien, ukuran tubuh yang besar, siklus reproduksi yang cepat, dan temperamen yang ramah. Tikus Wistar sangat mirip dengan manusia dalam fisiologi, menjadikannya model yang penting dalam penelitian kesehatan untuk mempelajari diabetes, obesitas, penyakit kardiovaskular, dan kanker. Sebelum obat baru diuji pada manusia, mereka digunakan dalam penelitian farmakologi dan toksikologi. Galur ini juga sering digunakan dalam studi nutrisi untuk mengevaluasi bagaimana diet atau suplemen tertentu berdampak pada kesehatan, serta dalam penelitian perilaku karena temperamennya yang ramah. Selain itu, tikus Wistar dapat direkayasa untuk membuat model penyakit tertentu.

Karena tikus Wistar memiliki banyak keunggulan yang signifikan dibandingkan dengan galur tikus lain, tikus ini sering digunakan sebagai model untuk penelitian *collagen loss*. Pertama, kulit tikus Wistar memiliki karakteristik yang memudahkan penelitian efek penuaan foto, seperti ketebalan dan komposisi kulit, yang memungkinkan peneliti untuk dengan mudah melihat perubahan morfologis dan histologis yang terkait dengan kerusakan akibat paparan sinar ultraviolet. Kedua, respons imunologis tikus Wistar terhadap stres lingkungan, termasuk paparan sinar ultraviolet, cukup

mirip dengan respons manusia, membuatnya menjadi model yang lebih relevan secara fisiologis untuk penelitian efek penuaan foto. Ketiga, ukuran tubuh yang relatif besar dari tikus Wistar memudahkan penggunaan dosis UV yang tepat, serta pengambilan sampel kulit untuk analisis lebih lanjut. Dengan semua keuntungan ini, tikus Wistar adalah pilihan yang bagus untuk studi *photoaging* karena memungkinkan peneliti untuk mempelajari lebih lanjut tentang proses penuaan kulit yang disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet dan potensi solusi untuk mencegah atau memperlambat proses tersebut.

Intensitas dan frekuensi paparan UVB untuk menginduksi kerugian kolagen pada tikus Wistar dalam penelitian model *photoaging* dapat bervariasi tergantung pada desain eksperimen dan tujuan penelitian. Secara umum, protocol bisa dirancang untuk secara bertahap mengekspos tikus ke UVB dengan intensitas dan frekuensi yang dikontrol untuk meniru efek *photoaging* pada kulit. Penting untuk dicatat bahwa dosis dan frekuensi yang spesifik harus ditentukan dengan hati-hati untuk menghindari kerusakan berlebihan yang bisa menyebabkan luka bakar kulit atau kanker kulit, sekaligus cukup untuk menginduksi perubahan *photoaging* yang signifikan. Beberapa studi menggunakan intensitas sekitar 120-200 mJ/cm² per eksposur UVB, dengan frekuensi paparan 3-5 kali per minggu selama 5 hari hingga beberapa minggu tergantung dari tingkat keparahan penyakit yang akan dibuat.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Collagen loss merupakan kondisi berkurangnya densitas kolagen yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen akibat beberapa faktor, termasuk paparan UVB yang terjadi secara terus menerus. Tapak Doro dikenal mengandung zat aktif seperti flavonoid, terpenoid dan tannin yang bersifat antioksidan dan antiinflamasi yang mampu menghambat inflamasi berkepanjangan akibat paparan UVB.^{12,44}

Paparan UVB dapat menyebabkan kerusakan pada DNA di dalam sel kulit yang memicu berbagai mekanisme respons, termasuk ekspresi protein P53 yang berperan penting dalam menjaga stabilitas genom dan memicu respons terhadap kerusakan DNA. Ketika DNA rusak, P53 dapat mengaktifkan jalur apoptosis dengan mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam proses tersebut, termasuk ekspresi protein Sitokrom C. Ekspresi Sitokrom C di dalam sel dapat memicu jalur kematian sel melalui jalur mitokondria. Sitokrom C dilepaskan dari mitokondria ke dalam sitoplasma sebagai respons terhadap kerusakan DNA, di mana ia berinteraksi dengan protein-protein seperti Caspase 9. Aktivasi Caspase 9 kemudian memicu kaskade aktivasi Caspase 3, yang berujung pada kematian sel atau apoptosis. Apoptosis sel akan menghasilkan pelepasan DAMP yang dapat mengaktifkan jalur sinyal NF- κ B melalui pemisahan

kompleks protein NfκB-IKK, sehingga dapat memicu proses transkripsi protein inflamasi, termasuk IL-1β.⁴⁵

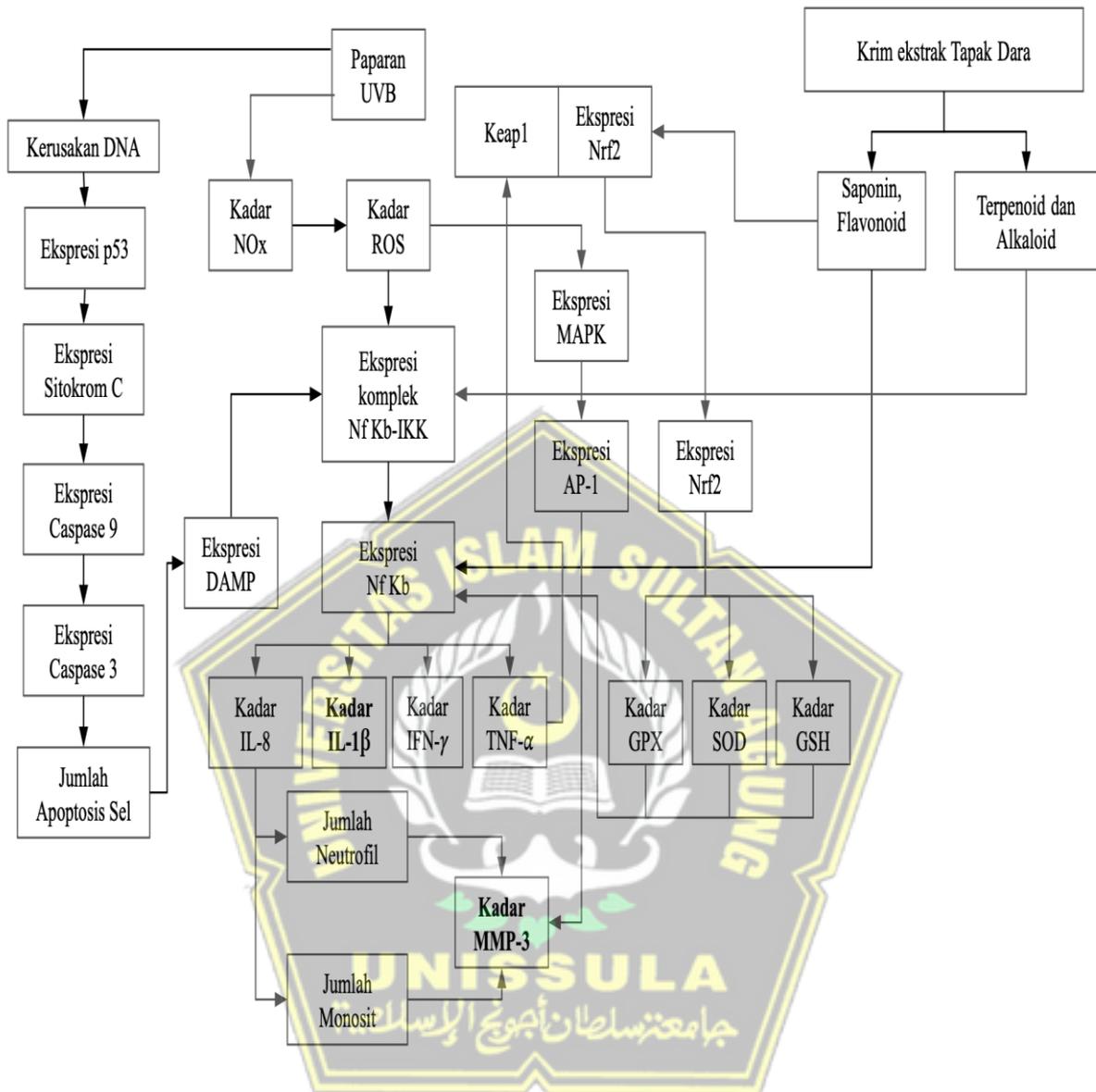
Paparan UVB memicu peningkatan produksi ROS di dalam sel kulit. ROS, sebagai molekul reaktif, kemudian dapat mengaktifkan jalur MAPK, terutama JNK dan p38 MAPK. Aktivasi MAPK ini akan mengarah pada aktivasi faktor transkripsi AP-1 memainkan peran kunci dalam mengatur ekspresi gen-gen targetnya. Salah satu gen yang diatur oleh AP-1 adalah gen MMP3.⁴⁶

Protein IL-1β yang diproduksi oleh sel-sel kulit seperti keratinosit dan sel-sel dendritik sebagai respons terhadap paparan UVB berperan sebagai chemoattractant yang menarik neutrofil dan monosit ke area yang terkena paparan UVB. Neutrofil dan monosit yang terpancang ke area tersebut dapat merespons dengan melepaskan MMP-3. Selain itu, IL-1β juga dapat merangsang sel-sel kulit sendiri untuk memproduksi MMP-3. Hal ini menunjukkan bahwa IL-1β berperan dalam memicu migrasi sel-sel imun ke area yang terkena, di mana MMP-3 dilepaskan sebagai bagian dari respons inflamasi, yang dapat berkontribusi pada peradangan kulit dan proses patologis terkait lainnya.

Tapak Doro mengandung flavonoid seperti kaempferol dan kuarsetin; terpenoid seperti vindolin, vindolinin, dan Tannin. Kaempferol dan kuarsetin diketahui dapat meningkatkan produksi enzim antioksidan seperti SOD, GPx, dan GSH yang dapat mengurangi kadar ROS melalui aktivasi Nrf-2. Hal ini berujung pada kembalinya keseimbangan ROS dan

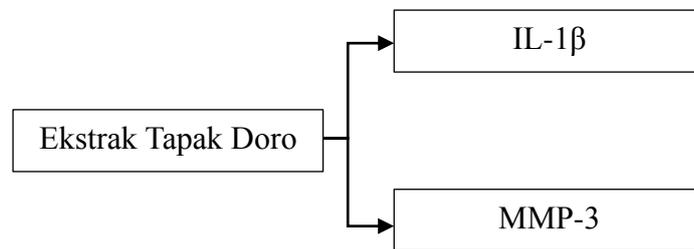
berhentinya produksi MMP-3. Selain itu kandungan jenis terpenoid yang terkandung dalam Tapak Doro seperti asiaticoside dan madecassoside diketahui dapat menghambat pemecahan Nf-kB dengan IKK berujung tidak teraktivasinya protein transkripsi tersebut dan penghentian produksi faktor inflamasi IL-1 β . Adapun hubungan antar variable tersebut digambarkan dalam Gambar 3.1.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Terdapat penurunan kadar IL-1 β dan MMP-3 pasca pemberian krim Ekstrak Tapak Doro pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB dibandingkan kontrol



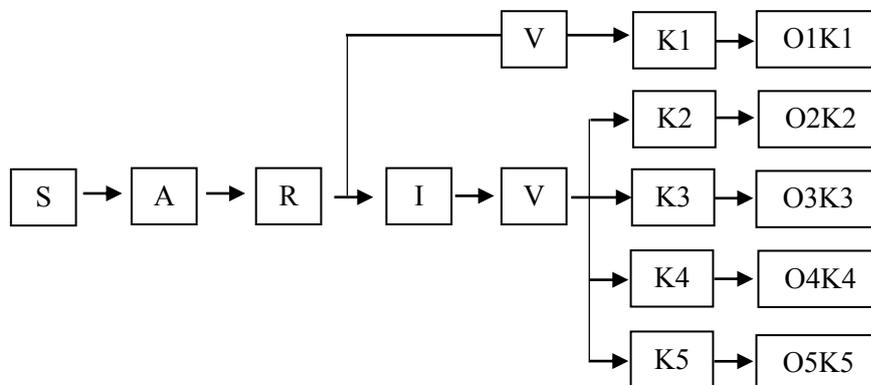
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental in-vivo yang menggunakan rancangan penelitian berupa *Post Test only Control Group Design* dengan metode rancang acak menggunakan hewan coba tikus sebagai objek penelitian yang dipaparkan sinar UVB. Pemilihan *Post Test only Control Group Design* dilakukan karena desain ini memungkinkan evaluasi efek paparan sinar UVB pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara terpisah, sehingga memungkinkan identifikasi perbedaan akibat intervensi perlakuan Tapak Doro tersebut. Dengan menggunakan kelompok kontrol yang tidak diberi intervensi perlakuan pasca terpapar sinar UVB, penelitian dapat lebih spesifik dalam menilai dampak langsung dari Tapak Doro terhadap paparan sinar UVB terhadap tikus objek penelitian yang mengalami *collagen loss*.⁴⁶

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut:



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian⁴⁷

Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

R = Random

I = Induksi UVB

V = Validasi densitas kolagen menggunakan Masson Trichrome

K1 = tikus sehat tidak diberi perlakuan

K2 = tikus dipapar UVB diberi perlakuan *Base cream*

K3 = Tikus dipapar UVB diberi krim Vitamin E

K4 = Tikus dipapar UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 10%

K5 = Tikus dipapar UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 20%

O1K1 = Observasi IL-1 β dan kadar MMP-3 K1

O2K2 = Observasi IL-1 β dan kadar MMP-3 K2

O3K3 = Observasi IL-1 β dan kadar MMP-3 K3

O4K4 = Observasi IL-1 β dan kadar MMP-3 K4

O5K5 = Observasi IL-1 β dan kadar MMP-3 K5

4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional

4.2.1 Variabel penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah krim Ekstrak Tapak Doro dosis 10% dan 20%

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar IL-1 β dan MMP-3

c. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah Sinar UVB

d. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah strain tikus

Wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2 Definisi Operasional Variabel

a. Ekstrak Tapak Doro

Ekstrak Tapak Doro produk konsentrat dari batang, daun dan bunga yang ditanam di Laboratorium SCCR Indonesia. Ekstrak Tapak Doro dihasilkan melalui ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dan diaduk menggunakan *head stirrer* dalam suhu ruang selama 48 jam, kemudian diikuti dengan evaporasi untuk menghilangkan pelarut pada suhu 60°C. Ekstrak Tapak Doro kemudian dimasukkan dalam pot plastic 5 mL dan disimpan dalam suhu 2-8°C.

b. Krim Ekstrak Tapak Doro

Krim Ekstrak Tapak Doro adalah krim dasar yang dibuat dari formula 30 mg *Adeps lanae*, 0,1 mg Nipagin, 0,1 mg minyak vanilla, dan 200 mg vaseline album yang kemudian dicampurkan secara homogen menggunakan homogenizer dengan Ekstrak Tapak Doro 10% untuk P4, dan 20% untuk P5.¹³ Standar pH untuk krim Ekstrak Tapak Doro adalah 7-7.5.

- Satuan mg (miligram)
- Skala rasio

c. Kadar Interleukin-1 β

Interleukin-1 β adalah sitokin pro-inflamasi yang dianalisis dari kulit yang diambil 24 jam setelah perlakuan terakhir diberikan. Jumlah

sampel jaringan kulit tikus sebanyak 5 mg dan dihomogenisasi menggunakan *Radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) buffer dengan alat ultra sonicator. Analisis dilakukan dengan metode ELISA yang dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

- Satuan pg/mL
- Skala ratio

d. Kadar MMP-3

Matrix Metaloproteinase-3 adalah enzyme pendegradasi kolagen yang dianalisis dari kulit yang diambil 24 jam setelah perlakuan terakhir diberikan. Jumlah sampel jaringan kulit tikus sebanyak 5 mg dan dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer dengan alat ultra sonicator. Analisis dilakukan dengan metode ELISA yang dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

- Satuan pg/mL
- Skala ratio

e. Sinar UV B

Dalam penelitian ini, sinar UVB merujuk kepada radiasi UVB yang dihasilkan oleh perangkat UVB narrowband tipe TL-F72-100W/12. Paparan sinar UVB dilakukan sebanyak 10 kali dalam 2 minggu pada punggung tikus (dengan jadwal 2 hari paparan sinar UVB, istirahat 1 hari). Dosis paparan sinar UVB adalah 1 MED dan durasi setiap paparan adalah 8 menit dengan jarak 20 cm.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subyek penelitian

Hewan percobaan yang dipakai dalam studi ini adalah Tikus Jantan Galur Wistar, berusia 6-8 minggu, dengan berat 200-250 gram, diakui layak oleh staf dokter hewan Laboratorium SCCR Indonesia. Tikus dipelihara pada suhu 20-28°C dengan ruangan bersirkulasi udara 24 jam dan siklus cahaya 12 jam gelap-terang. Pakan dan minum diberikan secara ad libitum.

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria inklusi

- a) Tidak ada kelainan anatomis
- b) Bergerak secara aktif

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- a) Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3 Kriteria Drop Out

- a) Tikus mengalami infeksi atau
- b) Tikus mati selama penelitian.

4.4. Besar Sampel

Penentuan besaran sampel (t) menggunakan ketentuan dari WHO dengan jumlah objek penelitian yang digunakan sebanyak 5 ekor tiap perlakuan sehingga total tikus yang digunakan adalah 25 ekor.⁴⁸

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat penelitian

- Penggiling dengan mesh 80 mm
- Head Stirrer
- Rotary evaporator
- Sentrifuge
- Waterbath
- Vaccum Pump
- *Circulated Chiller*
- Set kandang dengan tempat pakan dan minum
- alat cukur
- sarung tangan
- tempat fiksasi
- timbangan analitik
- objek glass
- kaca penutup
- pisau scalpel
- pinset
- freezer dengan suhu -20°C
- microtome
- mesin processor jaringan otomatis
- assay plate
- mikropipet *single channel*

- mikropipet multichannel
- incubator
- vortex
- lampu UVB tipe Narrowband TL-F72-100W/12
- UV Meter
- Spektrofotometer UV-Vis

4.5.2. Bahan penelitian

- Simplisia Tapak Doro
- Etanol Absolut
- Etanol 70%, 80%, dan 90%
- kertas saring
- Pellet
- Povidon iodine
- Masson trichrome staining kit
- Xylene
- Akuabides
- Mounting solution
- Elisa kit IL-1 β (Elabsience, cat. E-EL-R0012)
- Elisa kit MMP-3 (Elabsience, cat. E-EL-R0619)
- Akuabides



4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical clearance*

Penelitian dimulai dengan pengajuan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Langkah ini diambil setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji. Permohonan persetujuan etik ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika dalam penggunaan hewan percobaan. Selain itu, persetujuan etik juga menjamin bahwa perlakuan terhadap hewan coba akan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

4.6.2. Pembuatan Ekstrak Tapak Doro

Tapak Doro yang digunakan adalah yang ditanam di area Gedung SCCR Indonesia. Proses ekstraksi zat-zat aktif yang terkandung di dalam Tapak Doro diawali dengan mengeringkan bagian batang, daun, dan bunga Tapak Doro hingga kadar air kurang dari 5%, kemudian dihaluskan menggunakan mesin *grinder* 80 mm mesh. Selanjutnya, simplisia sebanyak 5 kg direndam dalam etanol 70% dan diaduk selama 48 jam pada suhu ruang untuk proses maserasi. Proses ini dilakukan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang larut dalam pelarut etanol. Waktu maserasi 48 jam diperlukan untuk memastikan waktu yang cukup bagi senyawa-senyawa aktif untuk terlarut sepenuhnya dalam pelarut. Selesai maserasi, simplisia diendapkan selama dua belas jam untuk

membedakan ekstrak dari sisa. Selanjutnya, ekstrak yang telah terlarut dalam etanol diambil dan kertas saring digunakan untuk menyaringnya. Setelah proses penyaringan, hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu evaporator untuk dievaporasi untuk membedakan etanol dari ekstrak. Ini dilakukan pada suhu 60°C dengan *vacuum pump* dan *chiller*, untuk menghasilkan ekstrak yang bebas dari pelarut. Setelah terpisah, ekstrak diambil dan disimpan pada suhu 2-8°C untuk dicampur dengan *base cream*. Proses ini dilakukan dengan tujuan mendapatkan Ekstrak Tapak Doro yang berkualitas tinggi. Ekstrak Tapak Doro yang akan dihasilkan kurang lebih 5 gr.

4.6.3. Pembuatan Krim

Krim ETD dibuat dari mencampurkan bahan *Adeps lanae* 30 mg, Nipagin 0,1 mg, vanila oil 0,1 mg, dan vaseline album 200 mg sebagai bahan krim dasar.¹³ Setelah krim dasar terbentuk, kemudian mencampurkan Ekstrak Tapak Doro sebanyak 20 mg dengan base cream 180 mg untuk P4 dan Ekstrak Tapak Doro sebanyak 40 mg dengan 160 krim dasar untuk P5. Selanjutnya, untuk memastikan kualitas krim ETD, dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter dan evaluasi homogenitas krim. pH krim pada penelitian ini berentang antara 7-7,5.

4.6.4. Penyinaran UVB pada subyek penelitian

Setelah periode adaptasi selama 7 hari, area punggung tikus dicukur dengan *clipper* (pemotong rambut) seluas 2x3 cm. Kemudian tikus dikenai paparan sinar UVB pada area yang telah dibersihkan dari rambut sesuai

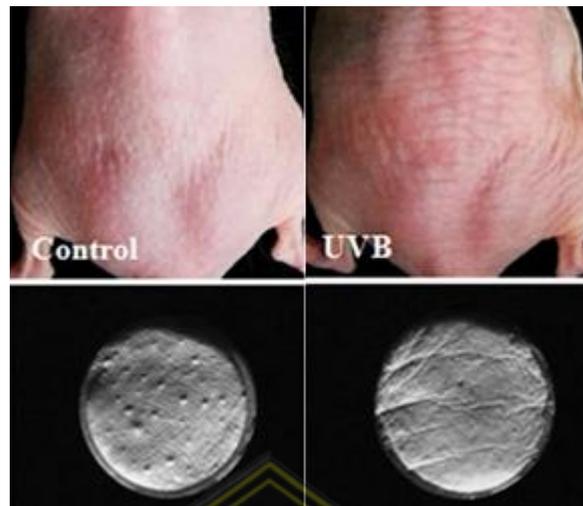
dengan penelitian terdahulu dengan modifikasi penambahan frekuensi paparan, dengan jarak 20 cm dan dosis minimal erythema (1 MED 150mJ/cm²) selama 8 menit, yang dilakukan 10 kali dalam 2 minggu pada punggung tikus (dengan jadwal 2 hari paparan sinar UVB, istirahat 1 hari).⁵

Setelah paparan UVB selesai, tikus menerima perlakuan, di mana kelompok kontrol positif diberikan krim vitamin E, sementara kelompok perlakuan 1 dan 2 diberikan Ekstrak Tapak Doro dengan dosis 10% dan 20% secara topikal sekali sehari selama 14 hari.

4.6.5. Validasi Hewan Coba

a. Makroskopis

Validasi makroskopis dilakukan untuk memverifikasi secara klinis keberhasilan paparan sinar UVB dalam menciptakan model hewan coba *collagen loss*. Proses validasi ini melibatkan inspeksi visual langsung terhadap kulit untuk mengevaluasi apakah ada tanda-tanda *collagen loss* pada hewan coba yang telah diberi paparan sinar UVB dibandingkan dengan tikus kontrol yang tidak menerima paparan tersebut. Hasil yang diharapkan secara visual sesuai dengan yang tergambar pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Validasi hewan coba kerutan akibat *collagen loss* pada tikus yang di paparkan sinar UVB dan yang tidak di paparkan sinar UVB pada hari ke-14.⁷⁴

b. Histopatology

Pengecatan Masson's Trichrome merupakan teknik pewarnaan histologi yang digunakan untuk menganalisis densitas kolagen pada jaringan kulit. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Jaringan kulit diambil dengan ukuran 3x3 cm dan difiksasi dalam larutan formalin 10% selama 24 jam
2. Jaringan kemudian diproses untuk membentuk blok parafin yang kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3 μ m dan diletakkan dalam kaca preparat tanpa *coating*.
3. Jaringan dalam kaca preparat kemudian dilakukan deparafin dengan cara menyelupkan preparat secara berturut-turut ke dalam larutan Xylene, Etanol absolut, Etanol 90%, Etanol 80%, Etanol 70% selama 2 menit tiap langkahnya

4. Bilas jaringan dengan menggunakan Aquabides selama kurang lebih 2 menit
5. Preparat kemudian ditempatkan dalam *humidity chamber*.
6. Reagen A ditambahkan pada preparat hingga menutupi seluruh permukaan jaringan, diikuti dengan penambahan reagen B dengan takaran yang sesuai pula. Setelah itu, chamber kelembapan ditutup.
7. Preparat didiamkan selama 10 menit.
8. Tanpa dibilas dengan air, cairan atau reagen pada preparat dibuang dan preparat dikeringkan secara singkat selama 5 detik.
9. Reagen C ditambahkan pada preparat secukupnya dan didiamkan selama 4 menit.
10. Preparat kemudian dibilas dengan Aquabides selama beberapa detik (3-4 detik).
11. Reagen D ditambahkan pada preparat dengan jumlah yang tepat dan didiamkan selama 4 menit.
12. Preparat sekali lagi dibilas dengan Aquabides selama beberapa detik (3-4 detik).
13. Reagen E ditambahkan pada preparat dengan takaran yang sesuai dan didiamkan selama 10 menit.
14. Reagen dibuang tanpa dibilas dengan air
15. Preparat dikeringkan secara singkat dengan diangin-anginkan selama 5 detik.

16. Preparat kemudian ditambahkan dengan reagen F dan didiamkan selama 5 menit.
17. Preparat dibersihkan dengan Aquabides.
18. Proses dehidrasi dilakukan secara bertahap dengan menyelamkan preparat dalam Etanol 70%, Etanol 80%, dan Etanol 90% secara cepat selama masing-masing 5-10 detik.
19. Proses dehidrasi dilanjutkan dengan merendam preparat dalam Etanol absolut dan Xylene masing-masing selama 1 menit.
20. Proses mounting dilakukan dengan menggunakan entelan untuk pengawetan sampel jaringan yang telah di cat
21. Hasil pengecatan akan menunjukkan warna biru untuk pengecatan kolagen.



Gambar 4.3. Pengecatan Masson Trichrome pada tikus yang di papir sinar UV dan yang tidak di papir sinar UV⁴⁸

4.7. Langkah Penelitian

1. Persiapkan 25 ekor tikus jantan *strain* Wistar usia 6-8 minggu dengan berat 200-250 gram yang telah diadaptasi selama 7 hari (hari ke-1 sampai 7)
2. Cukur punggung tikus dengan *clipper* (pemotong rambut) seluas 2x3 cm

3. Lakukan penyinaran pada punggung tikus dengan sinar UVB dengan dosis minimal 1 MED dengan jarak 20 cm selama 8 menit sebanyak 10 kali dalam 2 minggu dengan jadwal 2 hari paparan sinar UVB, istirahat 1 hari (hari ke-8 sampai 21)
4. Hari ke-22 lakukan validasi densitas kolagen secara makroskopis dan histopatology menggunakan pengecatan masson trichrome
5. Setelah tikus yang terpapar UVB tervalidasi mengalami *collagen loss*, berikan perlakuan pada tikus sesuai kelompoknya K1, K2, K3, K4, dan K5 sebanyak 1 kali per hari, selama 14 hari (hari ke-22 sampai hari ke-35)
6. Setelah hari ke-35. Istirahatkan tikus selama 24 jam
7. Hari ke-36, tikus diterminasi dan diambil biopsy jaringan kulit yang terpapar UVB untuk dihomogenisasi sebelum pemeriksaan ELISA, dengan cara berikut :
 - a. Diseksi jaringan yang diinginkan menggunakan peralatan yang steril, di atas es jika memungkinkan, dan segera setelahnya untuk mencegah kerusakan oleh protease.
 - b. Masukkan jaringan ke dalam tabung mikrofuge berbentuk bulat dan rendam dalam nitrogen cair untuk melakukan "*snap freeze*" untuk mengawetkan protein karena tidak langsung dianalisis.
 - c. Simpan sampel pada suhu -80 derajat Celcius untuk digunakan nanti atau di atas es untuk homogenisasi segera.

- d. Sampel jaringan kulit diambil sekitar 5 mg, tambahkan sekitar 300 μ L larutan RIPA buffer ditambah dengan protease inhibitor ke dalam tabung.
 - e. Homogenisasi jaringan dilakukan selama 2 menit pada suhu 4°C
 - f. Setelah jaringan sudah lisis sempurna, bilas mata homogenizer dua kali dengan menggunakan 300 μ L larutan RIPA buffer.
 - g. Hasil homogenisasi disentrifuge selama 20 menit pada kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 4 ° C.
 - h. Supernatan yang terbentuk diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang baru dan disimpan dalam -80°C hingga proses analisis berikutnya dilakukan.
8. Periksa kadar IL-1 β dan MMP-3 menggunakan ELISA adalah sebagai berikut⁴⁹
- a. Pembuatan Standar: Persiapan standar yang mengandung kadar yang diketahui dari IL-1 β dan MMP-3 untuk membuat kurva standar.
 - b. *Blocking* (Blokir): Tahap untuk mencegah ikatan nonspecific dengan menutup sisa-sisa area kosong pada mikrotiter plate.
 - c. Pemberian Sampel dan Kontrol: Penambahan sampel (serum, plasma, atau supernatan sel) yang akan diuji, serta kontrol positif dan negatif.
 - d. Inkubasi: Inkubasi plate sehingga IL-1 β dan MMP-3 dari sampel dan standar tertangkap oleh antibodi yang terdapat pada masing-masing plate.

- e. Cucian (*Washing*): Membersihkan mikrotiter plate dari zat-zat yang tidak terikat.
- f. Pemberian Antibodi Deteksi (*Detection Antibody*): Menambahkan antibodi deteksi spesifik terhadap IL-1 β dan MMP-3 yang terikat pada target.
- g. Penambahan Enzim Konjugat: Menambahkan enzim yang terikat pada antibodi deteksi.
- h. Pemberian Substrat: Penambahan substrat enzimatik yang akan menghasilkan sinyal berwarna.
- i. Pemberhentian Reaksi dan Pembacaan: Reaksi dihentikan dan intensitas warna diukur dengan spektrofotometer.
- j. Analisis Data: Hasil absorbansi diplot pada kurva standar untuk menentukan kadar IL-1 β dan MMP-3 dalam sampel.

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

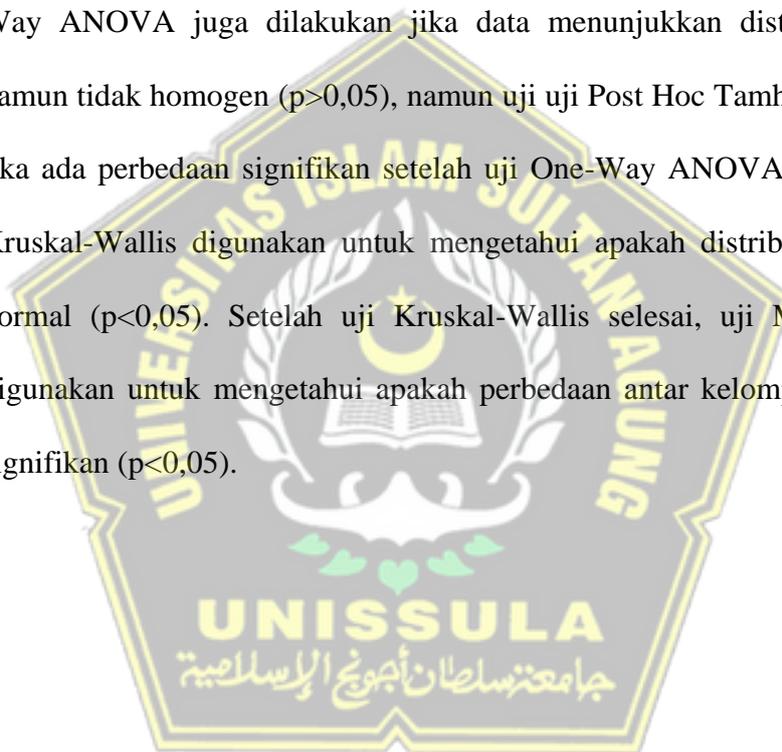
Pembuatan ekstrak dan krim Ekstrak Tapak Doro dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia Semarang. Pemeliharaan, induksi hewan coba, dan perlakuan hewan coba dilakukan di Animal Model Research Center SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada bulan April-Mei 2024.

4.9. Analisa Data

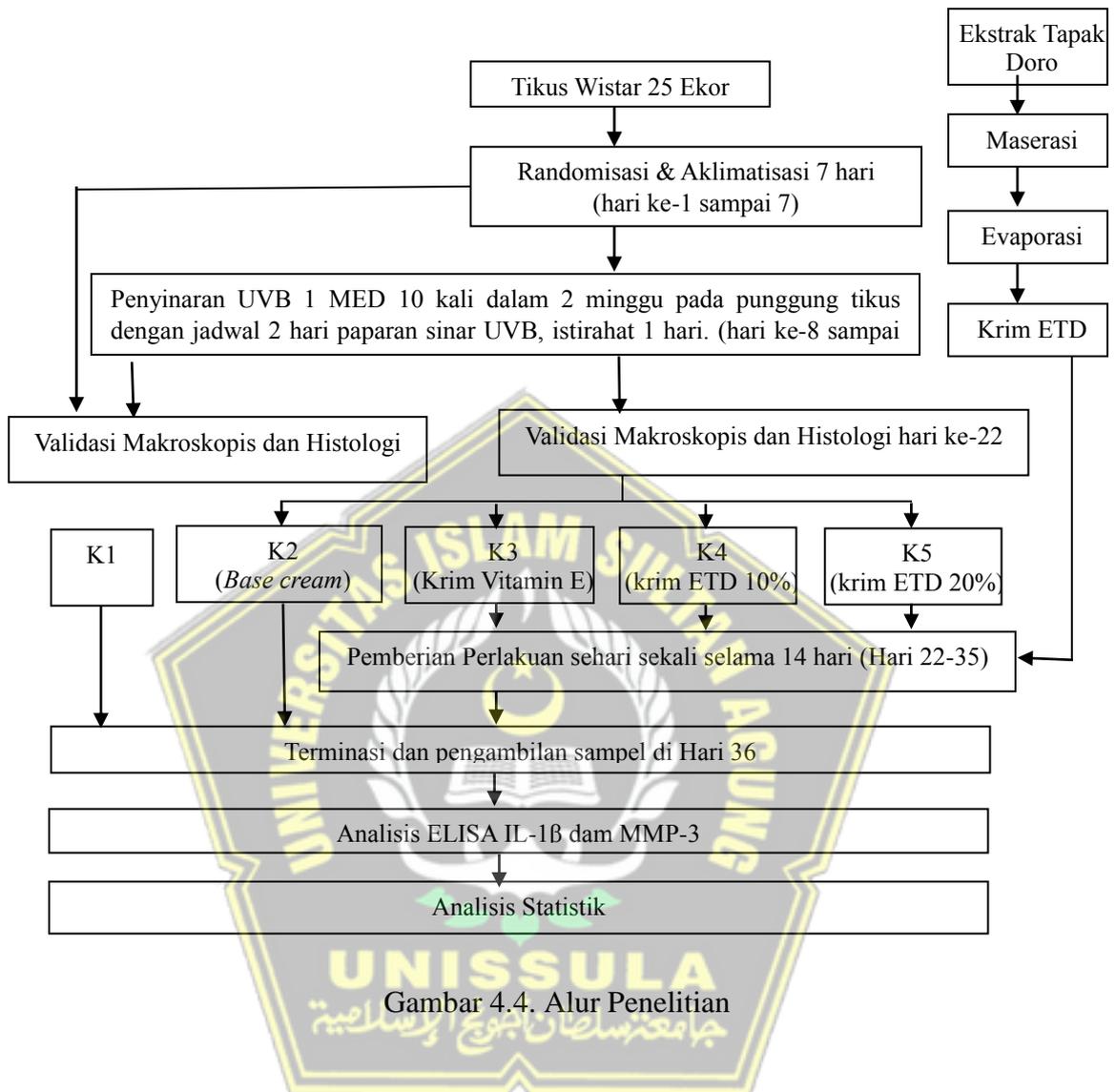
Analisis data dilakukan dengan software SPSS. Uji deskriptif akan digunakan untuk mengukur kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Wistar dari penelitian ini. Skala data yang digunakan adalah skala rasio. Setelah itu data

diperoleh, uji Shapiro-Wilk dan Levene digunakan untuk menganalisis normalitas dan variasi data.

Jika hasil menunjukkan distribusi data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), uji One-Way ANOVA akan dilakukan. Setelah uji One-Way ANOVA, uji Post Hoc LSD akan digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan di antara semua kelompok penelitian. Uji One-Way ANOVA juga dilakukan jika data menunjukkan distribusi normal namun tidak homogen ($p > 0,05$), namun uji Post Hoc Tamhane dilakukan jika ada perbedaan signifikan setelah uji One-Way ANOVA ($p < 0,05$). Uji Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah distribusi data tidak normal ($p < 0,05$). Setelah uji Kruskal-Wallis selesai, uji Mann-Whitney digunakan untuk mengetahui apakah perbedaan antar kelompok penelitian signifikan ($p < 0,05$).



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.4. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian Ekstrak Tapak Doro terhadap kadar IL-1 β dan MMP-3 pada tikus *collagen loss*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan April sampai Mei 2024 bertempat di Integrated Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Gunung Pati, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia.

Penelitian menggunakan Tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 25 ekor tikus sesuai kriteria WHO. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok, K1 adalah kelompok tikus sehat tidak diberi perlakuan; K2 adalah kelompok tikus dipapar UVB diberi perlakuan *Base cream*; K3 adalah kelompok Tikus dipapar UVB diberi krim Vitamin E; K4 adalah kelompok Tikus dipapar UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 10% dan K5 adalah kelompok Tikus dipapar UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 20%.

Tikus sebelumnya diberikan paparan sinar UVB dengan dosis minimal 1 MED dari jarak 20 cm selama 8 menit, dilakukan sebanyak 10 kali dalam 2 minggu (dengan jadwal 2 hari paparan sinar UVB, istirahat 1 hari). Pengamatan visual dan histopatology dilakukan untuk melihat kemunculan kerutan sebagai efek dari paparan UVB.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1 Uji Kualitatif Skrining Fitokimia

Uji kualitatif merupakan metode penapisan fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Hal – hal

yang berperan penting pada skrining fitokimia antara lain pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Dalam hasil skrining senyawa fitokimia Ekstrak Tapak Doro (*Catharanthus roseus*) dapat dinilai kandungan senyawa metabolit sekunder yang dilihat dengan visualisasi warna yang dihasilkan masing – masing senyawa yang dapat dilihat pada tabel 5.1.

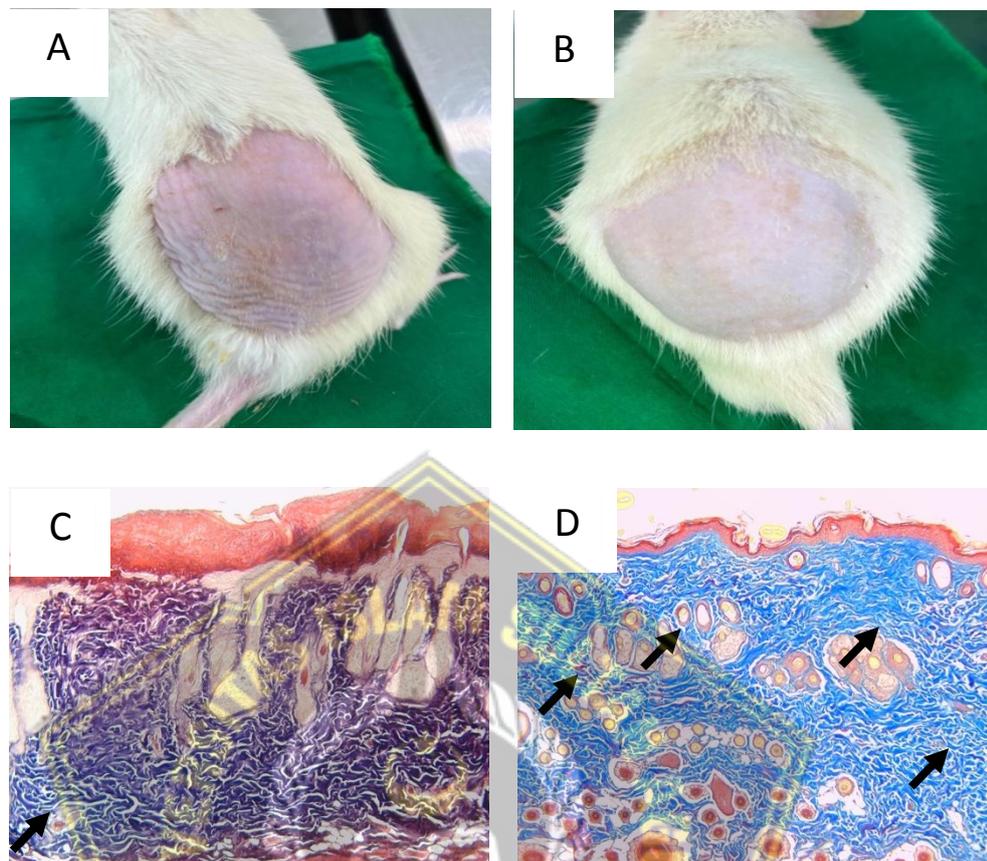
Tabel 5. 1. Profil Fitokimia Ekstrak Tapak Doro

Parameter Uji	Hasil Uji Kualitatif	Metode
Fenol	Dark Green	FeCl ₃
Tanin	Dark blue	FeCl ₃
Flavonoid	Orange red precipitate	Pb(CH ₃ COO) ₂
Alkaloid	White cream precipitate	Mayer's reagent
Terpenoid	Red purple	(CH ₃ CO) ₂ + H ₂ SO ₄
Saponin	Frothing	HCl

Berdasarkan analisis yang dapat dilihat dalam tabel 5.1, ditemukan bahwa ekstrak tapak doro mengandung senyawa fenol, tanin, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan saponin.

5.1.2. Validasi Tikus Model *Collagen loss*

Paparan sinar UVB dengan dosis minimal 1 MED dari jarak 20 cm selama 8 menit, dilakukan sebanyak 10 kali dalam 2 minggu (dengan jadwal 2 hari paparan sinar UVB, istirahat 1 hari) pada kulit tikus terbukti menyebabkan kerutan jika dibandingkan dengan kelompok tikus tidak diberi paparan sinar UVB yang tergambarkan secara morfologis sebagai berikut :



Gambar 5.1. Validasi *Collagen loss*. Tikus yang terpapar UVB (A) memiliki kulit dengan kerutan lebih jelas yang dibandingkan dengan tikus tanpa paparan UVB (B). Kolagen yang berwarna biru (panah hitam) nampak lebih sedikit pada tikus yang dipapar UVB (C), dibanding dengan tikus tanpa paparan UVB (D)

5.1.3. Kadar Interleukin 1β dan MMP-3

Penelitian menggunakan Tikus Jantan Galur Wistar sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 25 ekor tikus sesuai kriteria WHO. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok, K1 adalah kelompok tikus sehat tidak diberi perlakuan; K2 adalah kelompok tikus dipapar UVB diberi perlakuan *Base cream*; K3 adalah kelompok Tikus dipapar UVB diberi krim Vitamin E; K4 adalah kelompok Tikus dipapar

UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 10% dan K5 adalah kelompok Tikus dipapar UVB diberi krim Ekstrak Tapak Doro dosis 20%.

Kelompok tikus yang telah tervalidasi mengalami *collagen loss* setelah paparan UVB dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu K2, K3, K4 dan K5. Perlakuan diterapkan setiap hari selama 14 hari, dan pada hari ke-15 sampel jaringan diambil. Jaringan ini kemudian dihomogenisasi dengan buffer RIPA yang mengandung protease inhibitor. Setelah jaringan menjadi suspensi, dilakukan sentrifugasi untuk mengumpulkan supernatan, yang kemudian dianalisis untuk kadar IL-1 β dan MMP-3 menggunakan metode ELISA.

Kadar IL-1 β dan MMP3 diukur berdasarkan nilai absorbansi sampel menggunakan instrumen spektrofotometer pada gelombang 450 nm. Hasil absorbansi kemudian diolah menggunakan excel dan dilakukan uji statistik. Mula - mula dilakukan uji deskriptif, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji Shapiro Wilk dan uji varian data menggunakan uji Levene's Test. Data yang dihasilkan memiliki sebaran data normal ($p>0,05$) dan varian data sama ($p>0,05$), maka dilanjutkan menggunakan uji beda uji One Way Anova. Uji One Way Anova diperoleh nilai $p<0,05$, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data pada penelitian menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows. Hasil analisis kadar IL-1 β ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2. Data Hasil Analisis Kadar IL-1 β dan MMP-3

VARIABEL	Kelompok					P
	K1 (pg/mL)	K2 (pg/mL)	K3 (pg/mL)	K4 (pg/mL)	K5 (pg/mL)	
IL-1β	162,8	1215	916	627	551	
Std. Deviasi	74	178	134	44	130	
Shapiro wilk						>0,05
Lavene test						0,108
One Way Anova						0,000
MMP-3	760	7882	5743	4328	3464	
Std. Deviasi	312	780	600	308	684	
Shapiro wilk						>0,05
Lavene test						0,153
One Way Anova						0,000

Keterangan:

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

**Levene's test ($P > 0,05$ = homogen)

*** Uji One Way Anova ($P < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil analisis pada tabel 5.2. ditemukan bahwa kadar IL-1 β tertinggi ditemui pada kelompok K2 yaitu sebesar 1215 ± 178 pg/mL diikuti oleh K3 sebesar 916 ± 134 pg/mL sedangkan terendah pada kelompok K1 yaitu sebesar $162,8 \pm 74$ pg/mL. Berdasarkan perbandingan dengan kontrol, kelompok yang diberi krim Ekstrak Tapak Doro dengan dosis 20% (K5) memberikan hasil yang paling rendah yaitu sebesar 551 ± 130 pg/mL diikuti dengan (K4) sebesar 627 ± 44 pg/mL. Kedua perlakuan krim Tapak Doro baik dosis 10% dan 20% memberikan hasil lebih rendah dibandingkan krim terstandar menggunakan vitamin E. Uji Shapiro-Wilk digunakan untuk mengevaluasi normalitas distribusi data kadar IL-1 β di setiap kelompok. Hasil uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi

data kadar IL-1 β dalam kelima kelompok tersebut memenuhi asumsi normalitas ($P>0,05$). Untuk kelima kelompok, uji homogenitas varian data dilakukan dengan menggunakan uji Levene, dan hasilnya menunjukkan bahwa nilai P lebih besar dari 0,05 ($P>0,05$).

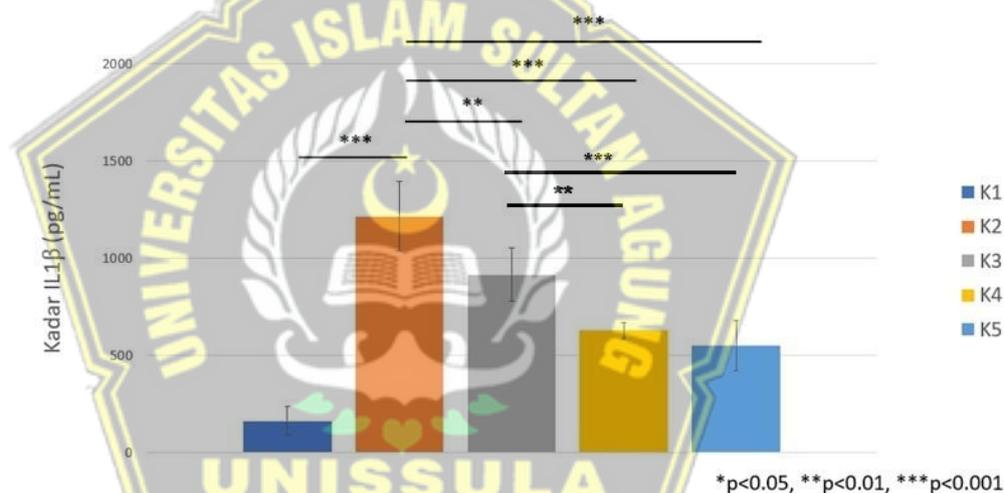
Berdasarkan hasil analisis pada tabel 5.2. ditemukan bahwa kadar MMP-3 tertinggi ditemui pada kelompok K2 yaitu sebesar 7883 ± 780 pg/mL diikuti oleh K3 sebesar 5743 ± 600 pg/mL sedangkan terendah pada kelompok K1 yaitu sebesar 760 ± 312 pg/mL. Berdasarkan perbandingan dengan kontrol, kelompok yang diberi krim Ekstrak Tapak Doro dengan dosis 20% (K5) memberikan hasil yang paling rendah yaitu sebesar 3464 ± 684 pg/mL diikuti dengan (K4) sebesar 4328 ± 308 pg/mL. Uji Shapiro-Wilk digunakan untuk mengevaluasi normalitas distribusi data kadar MMP-3 di setiap kelompok. Hasil uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi data kadar MMP-3 dalam kelima kelompok tersebut memenuhi asumsi normalitas ($P>0,05$). Untuk kelima kelompok, uji homogenitas varian data dilakukan dengan menggunakan uji Levene, dan hasilnya menunjukkan bahwa nilai P lebih besar dari 0,05 ($P>0,05$).

Terhadap kelima kelompok, dilakukan uji statistic parameterik dengan syarat memenuhi data distribusi normal dan homogen ($P>0,05$), maka dilakukan uji One Way ANOVA dan didapatkan dengan $P<0,05$ yang dapat dilihat pada tabel 5.1. Hal ini berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dalam kadar IL-1 β dan MMP-3 untuk selanjutnya melihat perbedaan antar kelompok dilakukan uji Post Hoc LSD, lihat Tabel 5.3.

Tabel 5. 3. Uji Post hoc LSD kadar IL-1 β

	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,000	0,000	0,000	0,000
K2	0,000	-	0,001	0,000	0,000
K3	0,000	0,001	-	0,001	0,000
K4	0,000	0,000	0,001	-	0,334
K5	0,000	0,000	0,000	0,334	-

Hasil uji post hoc LSD kadar IL-1 β menunjukkan bahwa nilai $p < 0,05$ untuk semua kelompok jika dibandingkan dengan kelompok K1. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa kelompok K4 dan K5 yang menerima krim Ekstrak Tapak Doro menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan K1, K2 dan K3 ($P < 0,05$). Data juga menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok K4 dan K5 ($P > 0,05$).

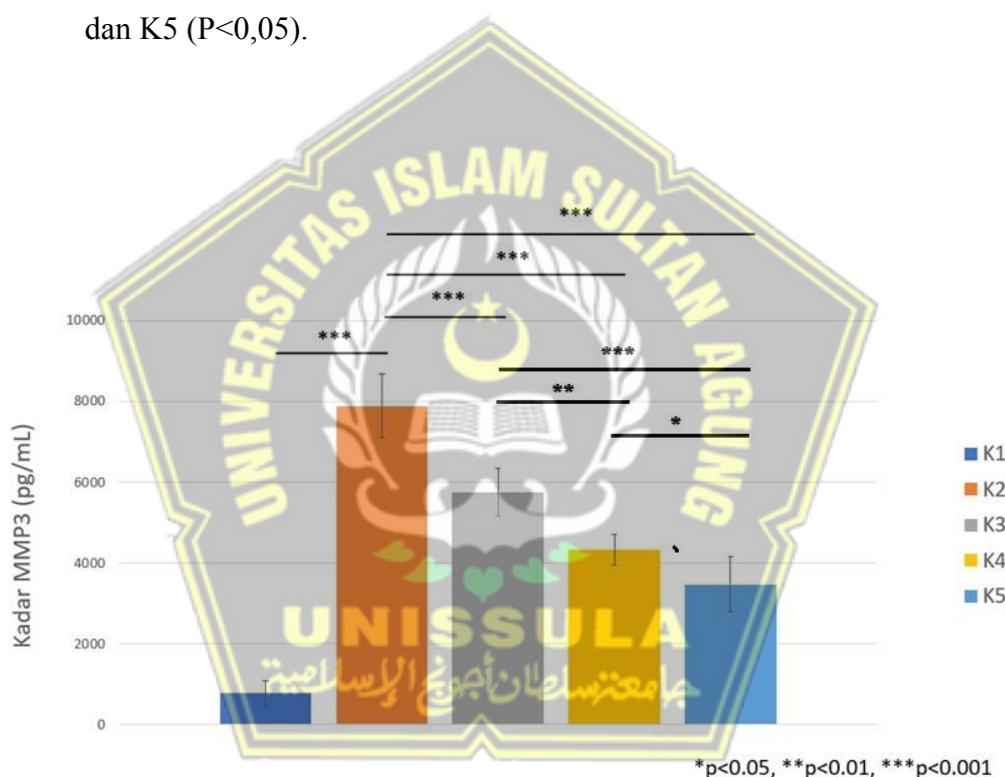


Gambar 5.2. Kadar IL-1 β setelah pemberian krim Ekstrak Tapak Doro pada tikus yang terpapar UVB. Signifikansi * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabel 5. 4. Uji Post hoc LSD Kadar MMP-3

	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,000	0,000	0,000	0,000
K2	0,000	-	0,000	0,000	0,000
K3	0,000	0,000	-	0,001	0,000
K4	0,000	0,000	0,001	-	0,027
K5	0,000	0,000	0,000	0,027	-

Hasil uji post hoc LSD kadar MMP-3 menunjukkan bahwa nilai $P < 0,05$ untuk semua kelompok jika dibandingkan dengan kelompok K1. Hasil analisis MMP-3 juga menunjukkan bahwa kelompok K4 dan K5 yang menerima krim Ekstrak Tapak Doro menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan K1, K2 dan K3 ($P < 0,05$). Data juga menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok K4 dan K5 ($P < 0,05$).



Gambar 5.3. Kadar MMP-3 setelah pemberian krim Ekstrak Tapak Doro pada tikus yang terpapar UVB. Signifikansi * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui penggunaan krim Ekstrak Tapak Doro baik pada konsentrasi 10% dan 20% terbukti mampu menurunkan kadar IL- 1β dan MMP-3 lebih baik dibandingkan dengan krim Vitamin E. Hal ini

menunjukkan bahwa ekstrak krim Tapak Doro lebih efektif dalam menekan inflamasi yang berujung pada penurunan *collagen loss* pada tikus yang terpapar UVB. Namun demikian tidak ada perbedaan kadar IL-1 β pada dosis 10% dan 20%, hal ini kemungkinan dikarenakan rentang dosisnya masih berdekatan.

Respons akut kulit terhadap UVB adalah peradangan, seperti eritema dan edema, serta kerusakan DNA dan mitokondria yang disebabkan oleh ROS. Telah dilaporkan bahwa paparan UVB (290-320 nm) menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam produksi ROS pada sel keratinosit epidermal manusia seiring dengan penurunan viabilitas sel. Paparan UVB pada kulit dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan sehingga mengakibatkan stres oksidatif. Hal ini dapat meningkatkan produksi ROS, dan dapat memulai peradangan dan aktivasi sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , yang melibatkan banyak jalur termasuk NF-kB, Nrf-2, dan AP-1.⁵⁰⁻⁵² Hal ini sejalan dengan data yang dihasilkan dalam penelitian ini yang menemukan adanya peningkatan kadar IL-1 β pada tikus yang terpapar UVB.

Tapak Doro diketahui mengandung berbagai jenis biomolekul aktif seperti phenol, tannin, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan saponin yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Kandungan bahan aktif ini diketahui mampu mengaktifkan jalur Nrf2 yang berujung pada peningkatan enzim antioksidan sehingga dapat menghambat aktivasi NF-kB. Deaktivasi NF-kB akan menurunkan produksi IL-1 β yang berkorelasi terhadap penurunan peradangan.⁵³

Penurunan IL-1 β diketahui dapat menghambat produksi MMP-3 melalui jalur protein NF-kB dan MAPK.⁵⁴ Aktivasi MAPK akibat peningkatan IL-1 β akan memproduksi ROS secara berlebih yang diketahui akan menginduksi ekspresi matriks MMP-3 yang kemudian dapat mendegradasi kolagen menjadi komponen non-kolagen yang tidak bersifat elastis sehingga mengakibatkan percepatan penuaan berupa relaksasi kulit, kerutan semakin dalam, dan penurunan elastisitas kulit. Enzim MMP-3 berperan dalam degradasi kolagen, sehingga penurunan MMP-3 dapat menjadi penanda terdapat penurunan degradasi MES (Matriks Ekstra Seluler) sehingga berkorelasi terhadap penghambatan proses kerutan kulit. Oleh karena itu, penekanan produksi IL-1 β dapat menjadi strategi yang efektif untuk menghambat peningkatan kadar MMP-3 dan mengurangi *collagen loss* yang terkait dengan penuaan kulit. Temuan ini memberikan dasar untuk pengembangan terapi berbasis Tapak Doro untuk perawatan kulit yang bertujuan untuk menekan aktivitas IL-1 β dan MMP-3 guna mengurangi kerutan kulit. Namun demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme yang terlibat dalam regulasi IL-1 β dan MMP-3 serta potensi intervensi yang lebih spesifik dan efektif untuk perlindungan kulit dan perawatan penuaan. Penelitian ini menggunakan whole extract, sehingga tidak diketahui molekul aktif lainnya yang berperan dalam menghambat IL-1 β dan MMP-3. Keterbatasan ini harus menjadi dasar bagi penelitian selanjutnya.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh krim Ekstrak Tapak Doro terhadap penurunan kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh pemberian krim Ekstrak Tapak Doro terhadap penurunan kadar IL-1 β dan MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.
2. Terdapat perbedaan kadar IL-1 β pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20% dibandingkan dengan kontrol positif.
3. Terdapat perbedaan kadar MMP-3 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang diinduksi sinar UVB yang diberikan krim Ekstrak Tapak Doro 10% dan 20% dibandingkan dengan kontrol positif.

6.2. Saran

Penelitian ini tidak menganalisis zat aktif lainnya yang terkandung di dalam tapak doro yang berperan dalam menekan laju inflamasi. Selain itu penelitian ini sebaiknya menambah parameter molekuler lainnya menggunakan metode lain seperti *real time* PCR atau western blot untuk mengkonfirmasi marka lainnya kasus *collagen loss*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023.
2. Pourang A, Tisack A, Ezekwe N, Torres AE, Kohli I, Hamzavi IH, *et al*. Effects of visible light on mechanisms of skin photoaging. Vol. 38, *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 2022.
3. Shah K, Minkis K, Swary JH, Alam M. Photoaging. In: *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. 2022.
4. Hutapea CM, Subchan P, Putra A. *Clitoria ternatea* Flower Extract-Based Gel Elevates TGF- β 1 Gene Expression and Collagen Density in UVB-Induced *Collagen loss* Rat Skin. *J Kedokt Brawijaya*. 2023;
5. 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 Biol*. 2020;
6. Gracelia A, Sudharmono U. The Effectiveness of Rosy Periwinkle (*Catharanthus roseus*) and Cherry (*Muntingia calabura* L.) Decoction on SGOT and SGPT Serum in Male Wistar Strain Rats of Acute Hepatitis Model. *Abstr Proc Int Sch Conf*. 2019;
7. Ahmed M, Sahibzada MUK, Rasheed HM, Khan T, Wahid F, Farooq U, *et al*. Inhibition of Inflammation Associated Corneal Neovascularization by *Dalbergia sissoo* and *Catharanthus roseus* Leaf Extracts in an Animal Model. *South African J Bot*. 2022;
8. Putri RS, Putra A, Chodidjah, Darlan DM, Trisnadi S, Thomas S, *et al*. *Clitoria ternatea* flower extract induces platelet-derived growth factor (Pdgf) and gpx gene overexpression in ultraviolet (uv) b irradiationinduced *collagen loss*. *Med Glas*. 2023;
9. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 2015.

10. Ramadhani LA, Setyaningrum T, Kusumastuti EH. Skin Rejuvenation Profile in Dr. Soetomo General Hospital Surabaya. *Heal Notions*. 2019;
11. Tiong SH, Looi CY, Hazni H, Arya A, Paydar M, Wong WF, *et al.* Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules*. 2013;
12. Iqbal Z, Iqbal MS, Mishra K. Screening of antioxidant property in medicinal plants belonging to the family apocynaceae. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;
13. Leny L, Situmorang TNK, Siagian R, Hafiz I, Iskandar B. Ointment Formulation of Tapak Doro (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) Flower Ethanol Extract and its Activity in Burn-Healing. *Borneo J Pharm*. 2023;
14. Fattepur S, Nilugal KC, Theva Darshan T, Bacayo MFDC, Asmani F, Abdullah I, *et al.* Toxicological and pharmacological activity of ethanolic extracts of *Catharanthus roseus* in experimental animals. *Int J Med Toxicol Leg Med*. 2018;
15. Zhu M, Xu Q, Yang X, Zhan H, Zhang B, Liu X, *et al.* Vindoline Attenuates Osteoarthritis Progression Through Suppressing the NF- κ B and ERK Pathways in Both Chondrocytes and Subchondral Osteoclasts. *Front Pharmacol*. 2022;
16. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*. 2019.
17. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, *et al.* Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2021.
18. Pires S, Parker D. IL-1 β activation in response to *Staphylococcus aureus* lung infection requires inflammasome-dependent and independent mechanisms. *Eur J Immunol*. 2018;
19. McKim DB, Weber MD, Niraula A, Sawicki CM, Liu X, Jarrett BL, *et al.* Microglial recruitment of IL-1 β -producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety. *Mol Psychiatry*. 2018;

20. Lee SY, Kim JK, Jeon HY, Ham SW, Kim H. CD133 regulates IL-1 β signaling and neutrophil recruitment in glioblastoma. *Mol Cells*. 2017;
21. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
22. Xu A, Pei J, Yang Y, Hua B, Wang J. IL-1 β promotes A7r5 and HASMC migration and invasion via the p38-MAPK/Angpt-2 pathway. *Eur J Med Res*. 2022;
23. Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph B V., Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*. 2022.
24. Pothuganti Manoj Kumar, Madhuri Padala, Sudharshan Reddy Nelli, Surya Satyanarayana Singh. Anti - Inflammatory Activity of Quercetin and Kaempferol Is Limited to Tlr4 Stimulation in Monocytes. *Int J Life Sci Pharma Res*. 2022;
25. Asfa N, Mahfufah U, Pratama MKA, Rosa RA, Rumata NR, Nainu F. Immunosuppressive activity of *Momordica charantia* l. Fruit extract on the nf-kb pathway in *Drosophila melanogaster*. *Biointerface Res Appl Chem*. 2022;
26. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;
27. Wan J, Zhang G, Li X, Qiu X, Ouyang J, Dai J, et al. Matrix Metalloproteinase 3: A Promoting and Destabilizing Factor in the Pathogenesis of Disease and Cell Differentiation. *Frontiers in Physiology*. 2021.
28. Kim JM, Kim S young, Noh EM, Song HK, Lee GS, Kwon KB, et al. Reversine inhibits MMP-1 and MMP-3 expressions by suppressing of ROS/MAPK/AP-1 activation in UV-stimulated human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2018;

29. Tang SC, Liao PY, Hung SJ, Ge JS, Chen SM, Lai JC, et al. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- κ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin. *J Dermatol Sci*. 2017;
30. Yang J, Zhu Y, Duan D, Wang P, Xin Y, Bai L, et al. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2018;
31. Zhao F, Guo Z, Hou F, Fan W, Wu B, Qian Z. Magnoflorine Alleviates “M1” Polarized Macrophage-Induced Intervertebral Disc Degeneration Through Repressing the HMGB1/Myd88/NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome. *Front Pharmacol*. 2021;
32. Chang ML, Mei HC, Kuo IC, Hsiao G, Kuo YH, Lee CK. New terpenoids from *Chamaecyparis formosensis* (Cupressaceae) leaves with modulatory activity on matrix metalloproteases 2 and 9. *Molecules*. 2018;
33. Wei X, Luo C, He Y, Huang H, Ran F, Liao W, et al. Hepatoprotective Effects of Different Extracts From *Triphala* Against CCl₄-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Front Pharmacol*. 2021;
34. Pham HNT, Vuong Q Van, Bowyer MC, Scarlett CJ. Phytochemicals Derived from *Catharanthus roseus* and Their Health Benefits. *Technologies*. 2020.
35. *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle). *PlantwisePlus Knowl Bank*. 2022;
36. Nejat N, Valdiani A, Cahill D, Tan YH, Maziah M, Abiri R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb. *Scientific World Journal*. 2015.
37. Keerthana S, Mahalakshmi S, Kavitha S, Babu RNG, Sivaraj C, Arumugam P. Antioxidant and Anticancer Activities of Roots of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Res J Chem Environ*. 2021;
38. Kumar S, Singh B, Singh R. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022.

39. Kabesh K, Senthilkumar P, Rangunathan R, Kumar RR. Phytochemical Analysis of *Catharanthus roseus* Plant Extract and its Antimicrobial Activity. *Int J Pure Appl Biosci.* 2015;
40. Mulaudzi RB, Ndhlala AR, Van Staden J. Ethnopharmacological evaluation of a traditional herbal remedy used to treat gonorrhoea in Limpopo province, South Africa. *South African J Bot.* 2015;
41. Huang KF, Ma KH, Jhap TY, Liu PS, Chueh SH. Ultraviolet B irradiation induced Nrf2 degradation occurs via activation of TRPV1 channels in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2019;
42. Walczak K, Kazimierczak P, Szalast K, Plech T. Uvb radiation and selected tryptophan- derived ahr ligands—potential biological interactions in melanoma cells. *Int J Mol Sci.* 2021;
43. Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Abstract 4310: Regular intake of high-fat diet exacerbates oxidative stress-mediated DNA hypermethylation and activation of Nrf2-Keap1 signaling in UVB-induced skin tumors in SKH-1 hairless mice. *Cancer Res.* 2016;
44. Granados-López AJ, Manzanares-Acuña E, López-Hernández Y, Castañeda-Delgado JE, Fraire-Soto I, Reyes-Estrada CA, et al. Uvb inhibits proliferation, cell cycle and induces apoptosis via p53, e2f1 and microtubules system in cervical cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 2021;
45. Busch L, Kröger M, Zamudio Díaz DF, Schleusener J, Lohan SB, Ma J, et al. Far-UVC- and UVB-induced DNA damage depending on skin type. *Exp Dermatol.* 2023;
46. Li C, Liu W, Wang F, Hayashi T, Mizuno K, Hattori S, et al. DNA damage-triggered activation of cGAS-STING pathway induces apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *Mol Immunol.* 2021;
47. Widayati RE. Pengaruh Ekstrak Aloe Vera Topikal Terhadap Ekspresi Mmp-1 Dan Rasio Kolagen Tipe I dan III Studi Eksperimental pada Kulit Mencit Balb/c yang dipapar radiasi UVB. Universitas Islam Sultan Agung; 2017.

48. Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *J Craniofac Surg*. 2015;
49. Hinsberger M, Becker-Kettern J, Jürgens-Wemheuer WM, Oertel J, Schulz-Schaeffer WJ. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantification of ARID1A in Tissue Lysates. *Cancers (Basel)*. 2023;
50. Papaccio F, D Arino A, Caputo S, Bellei B. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jun 6;11(6):1121. doi: 10.3390/antiox11061121. PMID: 35740018; PMCID: PMC9220264.
51. Wei M, He X, Liu N, Deng H. Role of reactive oxygen species in ultraviolet-induced photodamage of the skin. *Cell Div*. 2024 Jan 12;19(1):1. doi: 10.1186/s13008-024-00107-z. PMID: 38217019; PMCID: PMC10787507.
52. Ujfaludi, Z., Tuzesi, A., Majoros, H. *et al*. Coordinated activation of a cluster of MMP genes in response to UVB radiation. *Sci Rep* **8**, 2660 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20999-6>
53. Lu R, Yu X, Liang S, Cheng P, Wang Z, He ZY, Lv ZT, Wan J, Mo H, Zhu WT, Chen AM. Physalin A Inhibits MAPK and NF- κ B Signal Transduction Through Integrin α V β 3 and Exerts Chondroprotective Effect. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 1;12:761922. doi: 10.3389/fphar.2021.761922. PMID: 34925020; PMCID: PMC8678602.
54. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich *Spatholobus Suberectus* Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes. *Nutrients*. 2019 Jun 14;11(6):1341. doi: 10.3390/nu11061341. PMID: 31207929; PMCID: PMC6627339.