

**PENGARUH KRIM EKSTRAK KULIT BATANG
NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*) TERHADAP
EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α PADA KULIT
(Study Eksperimental *in vivo* pada Tikus Jantan *Wistar*
dipapar sinar UVB Akut)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Amelia Fenowati

MBK.2220010308

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

TESIS

**PENGARUH KRIM EKSTRAK KULIT BATANG
NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*) TERHADAP
EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α PADA KULIT
(Study Eksperimental *in vivo* pada Tikus Jantan *Wistar*
dipapar sinar UVB Akut)**

Disusun Oleh:

Amelia Fenowati
MBK.2220010308

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 28 Agustus 2024 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

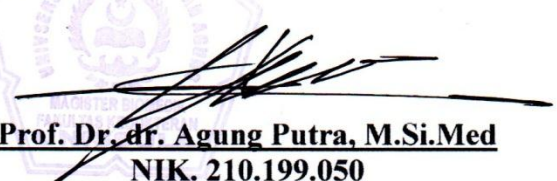
Pembimbing I,

Pembimbing II,


Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan,
Sp.DVE.Subsp.DKE.FINS DV.FAADV
NIP: 130 530 279


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

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210.199.050

SURAT 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 didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 28 Agustus 2024
Yang menyatakan,



(Amelia Fenowati)



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT sehingga tesis penulis berjudul **PENGARUH KRIM EKSTRAK KULIT BATANG NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*) TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α PADA KULIT (Study Eksperimental *in vivo* pada Tikus Jantan *Wistar* dipapar sinar UVB Akut)** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai Gelar Magister Ilmu Biomedik Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada :

1. Prof. Dr. H. Gunarto S.H. MHum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K)selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
5. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.

6. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Dr. dr. H. Hadi Sarosa M.Kes selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu dan kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Dr. Dra. Atina Hussana, Msi. Apt selaku dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu dan kesibukannya saat bimbingan tesis.
9. Seluruh tenaga pendidik dan staf administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banvak dukungan selama proses penyusunan tesis.
10. Suami dan anak-anak tercinta serta keluarga besar yg telah memberikan dukungan selama proses penyusunan tesis.
11. Teman-teman dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, April 2024
Penulis,

(Amelia Fenowati)

ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan sinar UVB akut dapat menginduksi kerusakan kulit dan memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , dan menekan growth factor seperti TGF- β . Ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi memiliki efek antiinflamasi.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada kulit tikus Wistar yang dipapar sinar UVB akut.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain post-test control group menggunakan tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok perlakuan diberikan krim ekstrak kulit batang nangka konsentrasi 2% dan 4% selama 5 hari, kemudian dipapar sinar UVB akut dengan alat sinar UV-B light broadband dengan dosis 1 Minimal Erythema Dose (MED) atau energi 360 mJ/cm² lama pemaparan 6 menit selama 5 hari dengan jarak 30 cm. Ekspresi TGF- β dan TNF- α dianalisis menggunakan metode imunohistokimia yang di analisis pada hari ke 6.

Hasil: Pemberian krim ekstrak kulit batang nangka konsentrasi 2% dan 4% menunjukkan peningkatan ekspresi TGF- β jika di bandingkan kelompok normal. Krim ekstrak kulit batang nangka 2% meningkatkan ekspresi TGF- β sebesar 17,18 \pm 1,54 dan kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 4% meningkatkan hingga 15,95 \pm 1,67. Pemberian krim ekstrak batang nangka menurunkan ekspresi TNF- α secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif pada kulit tikus yang dipapar sinar UVB akut. Ekspresi TNF- α pada kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 2% sebesar 1,14 \pm 0,26 dan efek penurunan lebih besar terlihat pada konsentrasi 4% yaitu 0,62 \pm 0,07.

Kesimpulan: Krim ekstrak kulit batang nangka memiliki potensi untuk menurunkan ekspresi TNF- α dan meningkatkan ekspresi TGF- β pada kulit yang terpapar sinar UVB akut, menunjukkan efek antiinflamasi yang menjanjikan untuk pencegahan kerusakan kulit akibat paparan UVB.

Kata kunci: Ekstrak kulit batang nangka, TGF- β , TNF- α , UVB akut, antiinflamasi

ABSTRACT

Background: Acute UVB radiation exposure can induce skin damage and trigger the release of proinflammatory cytokines such as TNF- α , while suppressing growth factors like TGF- β . Jackfruit bark extract (*Artocarpus heterophyllus*) contains flavonoid compounds that potentially have anti-inflammatory effects.

Objective: This study aims to analyze the effect of jackfruit bark extract cream on TGF- β and TNF- α expression in Wistar rat skin exposed to acute UVB radiation.

Method: This experimental study used a post-test control group design with male Wistar rats divided into control and treatment groups. The treatment groups were given jackfruit bark extract cream at concentrations of 2% and 4% for 5 days, then exposed to acute UVB radiation using a broadband UV-B light device at a dose of 1 Minimal Erythema Dose (MED) or energy of 360 mJ/cm² for 6 minutes of exposure daily for 5 days at a distance of 30 cm. TGF- β and TNF- α expressions were analyzed using immunohistochemistry method on day 6.

Results: The application of jackfruit bark extract cream at 2% and 4% concentrations showed an increase in TGF- β expression compared to the normal group. The 2% jackfruit bark extract cream increased TGF- β expression to 17.18 \pm 1.54, and the 4% group increased it to 15.95 \pm 1.67. The application of jackfruit bark extract cream significantly decreased TNF- α expression compared to the negative control group in rat skin exposed to acute UVB radiation. TNF- α expression in the 2% jackfruit bark extract cream group was 1.14 \pm 0.26, with a greater reduction effect observed at 4% concentration, namely 0.62 \pm 0.07.

Conclusion: Jackfruit bark extract cream has the potential to decrease TNF- α expression and increase TGF- β expression in skin exposed to acute UVB radiation, demonstrating promising anti-inflammatory effects for the prevention of skin damage due to UVB exposure.

Keywords: Jackfruit bark extract, TGF- β , TNF- α , acute UVB, anti-inflammatory

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. <i>Transforming growth factor-β</i>	8
2.1.1. Definisi <i>TGF - β</i>	8
2.1.2. Aktivasi <i>TGF - β</i>	10
2.2. <i>Tumor necrosis Factor- α</i>	12
2.3. <i>Photodamage</i>	15
2.4. Pohon Nangka	21
2.4.1. Manfaat Pohon Nangka.....	22

2.4.2.	Kandungan Pohon Nangka.....	22
2.4.3.	Efek Fotoproteksi Ekstrak Kulit Batang Nangka	26
2.4.4.	Sistem Pemberian Obat Melalui Kulit	27
2.4.5.	Krim	29
2.5.	Hubungan Ekstrak Kulit Nangka terhadap Ekspresi TNF-a dan TGF-B	30
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....		33
3.1.	Kerangka Teori.....	33
3.2.	Kerangka Konsep	35
3.3.	Hipotesis Penelitian	35
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN		36
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	36
4.2.	Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel	37
4.2.1.	Populasi	37
4.2.2.	Teknik Pengambilan Sampel.....	37
4.2.3.	Jumlah Sampel	37
4.3.	Variabel dan Definisi Operasional	38
4.3.1.	Variabel	38
4.3.2.	Definisi Operasional.....	38
4.4.	Bahan Penelitian.....	40
4.5.	Peralatan Penelitian	40
4.6.	Cara Penelitian.....	41
4.6.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	41
4.6.2.	Persiapan Sebelum Perlakuan	41
4.6.3.	Pembuatan Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka	41
4.6.4.	Terminasi Tikus	44
4.6.5.	Sediaan Biopsi Kulit	44
4.6.6.	Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF-a dan TGF-B menggunakan IHC	45
4.7.	Alur Penelitian.....	47
4.8.	Analisis Data	48

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
5.1. Hasil Penelitian.....	50
5.1.1. Ekstraksi Kulit Batang Nangka dan Uji Kualitatif Skrining Fitokimia	50
5.1.2. Efek Pemberian Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka Terhadap Ekspresi TGF- β Pada Tikus Galur Wistar Yang Dipapar UVB Akut.....	51
5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Galur Wistar Yang Dipapar UVB Akut.....	54
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	58
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1. Kesimpulan.....	63
6.2. Saran.....	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	72



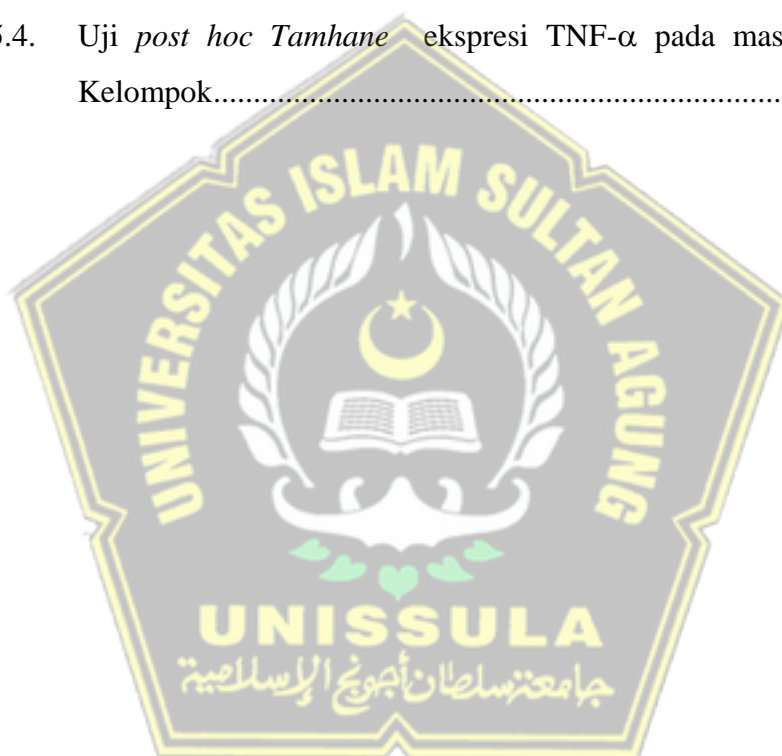
DAFTAR SINGKATAN

EGF	: <i>epidermal growth factor</i>
IL-1	: <i>interleukin-1</i>
JAK	: <i>Janus kinase</i>
KGF	: <i>keratinocyte growth factor</i>
LAPs	: <i>Latency Associated Proteins</i>
MAPK	: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
NF- κ B	: <i>nuclear factor kappa-B</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
STAT	: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- β	: <i>transforming growth factor-β</i>
TLRs	: <i>Toll Like Receptors</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor-α</i>
TNFR-1	: <i>tumor necrosis factor reseceptor 1</i>
UVB	: <i>ultraviolet B</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1.	Formula Pembuatan Krim Ekstra Kulit Batang Nangka	43
Tabel 5.1.	Uji skrining fitokimia ekstrak kulit batang nangka	51
Tabel 5.2.	Data hasil Penelitian Ekspresi TGF- β dan TNF- α	51
Tabel 5.3.	Uji <i>post hoc</i> LSD ekspresi TGF- β pada masing-masing Kelompok.....	53
Tabel 5.4.	Uji <i>post hoc</i> Tamhane ekspresi TNF- α pada masing-masing Kelompok.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ekspresi gen TGF- β	12
Gambar 2.2.	Mekanisme Pembentukan ROS dan RNS Saat Proses Inflamasi ..	14
Gambar 2.3.	Mekanisme Apoptosis Sel dan Mekanisme Pertahanan Sel.....	15
Gambar 2.4.	Mekanisme <i>photodamage</i>	17
Gambar 2.5.	Sintesis collagen pada photoaging.....	19
Gambar 2.6.	Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus Lamk</i>)	22
Gambar 2.7.	Rumus Senyawa Aktif Dalam Kulit Batang Nangka	26
Gambar 2.8.	Struktur Dasar Senyawa Flavonoid	27
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	34
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	35
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Renelitian.....	36
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	47
Gambar 5.1.	(A) Gambaran immunohistokimia elspresi TGF- β pada sampel kulit tikus dan (B) Grafik ekspresi TGF- β pada Seluruh Kelompok Penelitian. * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.....	53
Gambar 5.2.	(A) Gambaran immunohistokimia ekspresi TNF- α pada sampel kulit tikus dan (B) Grafik ekspresi TNF- α pada Seluruh Kelompok Penelitian. * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.....	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	72
Lampiran 2.	Uji Statistika	73
Lampiran 3.	Surat Ijin Penelitian	78
Lampiran 4.	Surat Selesai Penelitian	79
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian.....	80



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Photodamage adalah penuaan dini dan kerusakan pada kulit yang disebabkan oleh seringnya paparan radiasi ultraviolet B (UVB) yang dipicu akibat inflammasi.¹ Paparan UVB meningkatkan konsentrasi *reactive oxygen species* (ROS) yang menginisiasi jalur sinyal transduksi inflamasi *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) sehingga memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi *tumor necrosis factor- α* (TNF- α).^{2,3} Kadar TNF- α yang meningkat menyebabkan apoptosis keratinosit melalui jalur *tumor necrosis factor reseptor 1* (TNFR-1)^{4,5}, selanjutnya berkontribusi terhadap kerusakan kulit akibat penurunan regulasi *transforming growth factor- β* (TGF- β) yang bertanggung jawab terhadap homeostasis epitel sehingga mendorong *photodamage*.⁶ Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak kulit batang nangka mengandung metabolit sekunder yang memiliki aktivitas anti inflamasi dengan menurunkan kadar IL-1B dan TNF- α secara tergantung dosis.⁷ Pengaruh pemberian ekstrak kulit batang nangka dalam mencegah inflamasi pada kulit akibat paparan sinar UVB akut hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kulit batang nangka yang di formulasikan dalam bentuk sediaan krim terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β tikus jantan Wistar yang dipapar sinar UVB akut.

Indonesia adalah negara tropis dimana sepanjang tahun selalu disinari matahari. Paparan sinar UV dapat menyebabkan penuaan kulit dan kerusakan sebesar 80% sedangkan efek sinar UV yang bersifat kronis dapat memicu terjadinya *photodamage* dan karsinogenesis. Sekitar 98 – 99% respon eritem terjadi setelah paparan UVB dan mencapai puncaknya 12 – 24 jam setelah paparan.⁸ Saat ini terapi *photodamage* dan *photoaging* yang pertama adalah tretinoin, tretinoin dapat memperbaiki *photodamage*, namun memiliki berbagai efek samping seperti iritasi, kulit kering, dan menginduksi kanker kulit.⁹ Pencegahan *photodamage* dengan senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi potensial dan meminimalkan efek samping sangat dibutuhkan saat ini.

Salah satu tanaman yang dapat berfungsi sebagai antiinflamasi adalah tanaman nangka. Kulit batang nangka mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin yang berpotensi memiliki efek terapeutik. Kulit batang nangka mengandung senyawa bioaktif artocarpanone¹⁰ yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Senyawa ini telah menunjukkan efek seperti mengurangi pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan menghambat pengatur utama peradangan seperti aktivasi NF- κ B.¹¹ Kulit batang nangka juga dapat menurunkan kadar ROS dan peroksidasi lipid pada model tikus hairloss yang di induksi sinar UVB. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit batang nangka yang mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin dapat menekan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6 pada *wound*

*healing*¹⁰ Ekstrak etanol kulit nangka ini juga menurunkan kadar IL-1B dan TNFa secara tergantung dosis.⁷

Penelitian eksplorasi potensi ekstrak kulit batang nangka terhadap pencegahan *photodamage* akibat paparan sinar UVB akut masih belum jelas. Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh pemberian ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada kulit tikus galur wistar yang di induksi sinar UVB akut.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh krim ekstrak kulit batang nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar sinar UVB akut?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar sinar UVB akut.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka secara topikal dosis 2% dan 4% terhadap ekspresi TNF- α tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB akut dibandingkan dengan kontrol.

1.3.2.2. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka secara topikal dosis 2% dan 4% terhadap ekspresi TGF- β tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB akut dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus yang dipapar UVB akut.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah:

1.4.2.1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh krim ekstrak kulit batang nangka terhadap TNF- α dan TGF- β sel pada tikus yang dipapar UVB.

1.4.2.2. Hasil penelitian lebih lanjut diharapkan krim ekstrak kulit batang nangka dapat diaplikasikan pada kulit sebagai proteksi akibat paparan UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Tara Inastu Kandarpa, dkk,2021	Uji Efektivitas Epikarpium Buah Nangka (<i>Artocarpus Heterophyllus</i> lamar ck) sebagai sediaan krim tabir surya UV-B	<i>In vivo</i>	Ekstrak epikarpium buah <i>A. heterophyllus</i> memiliki aktivitas sebagai tabir surya dengan nilai SPF tertinggi pada konsentrasi 100% sebesar 23,96.
2.	Siti Umrah Noor, Dadan Teja Permana,2016	Formulasi ekstrak kulit batang nangka (<i>artocarpus heterophyllus</i> lamk.) didalam sabun emulsi minyak kedelai berscrub polietilen	<i>In vivo</i>	Formula terbaik adalah yang memiliki konsentrasi acrylates crosspolymer sebesar 3%.
3.	Maria Chatarina Indiradewi Hastiningsih, 2020	Krim ekstrak etanol kulit batang pohon nangka menghambat peningkatan ekspresi melanin melalui penlngkatan kadar sod-1 dan penurunan ekspresi 8-ohdg, ekspresi mcir serta kadar camp pada kulit marmut yang dipapar uvb	<i>In vivo</i>	Krim ekstrak etanol kulit batang pohon nangka 4% dapat menghambat stres oksidatif sehingga terjadi penurunan ekspresi melanin sebesar 18,13% pada epidermis kulit marmut melalui peningkatan kadar SOD-1 sebesar 2,41 mikro gram/mg, penurunan ekspresi 8OHdG sebesar 22,78%, ekspresi MCIR sebesar 27,33% dan kadar cAMP sebesar 0,37 mikro gram/mg dibandingkan dengan kelompok kontrol.
4.	Muh Nur Amir,dkk,2023	Studi <i>In vivo</i> Ekstrak Etanol Kulit Buah	<i>In vivo</i>	Ekstrak etanol kulit buah Nangka pada

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
		Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i> L.) Sebagai Kandidat Obat Analgetik Terhadap Model Hewan Uji Mencit (<i>Mus musculus</i>)		rentang dosis 300 mg/kg hingga 500 mg/kg memiliki aktivitas sebagai obat analgetik walaupun masih membutuhkan penelitian lebih lanjut kedepannya.
5.	Stella Giovanni,dkk, 2023	Pengaruh ekstrak kombinasi dan mikroemulsifikasi terhadap aktivitas hambatan tirosinase dan antioksidan dari kulit batang nangka (<i>artocarpus heterophyllus</i> l.) dan kulit buah delima (<i>Punica granatum</i> L.)	<i>In vivo</i>	inhibitor tirosinase dari ekstrak kombinasi menunjukkan efek sinergis.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa Ekstrak epikarpium buah *A. heterophyllus* memiliki aktivitas sebagai tabir surya dengan nilai SPF tertinggi pada konsentrasi 100% sebesar 23,96. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena pada penelitian ini akan menganalisa pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus model yang dipapar UVB akut. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa formula terbaik ekstrak kulit batang nangkan adalah yang memiliki konsentrasi *acrylates crosspolymer* sebesar 3%. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena pada penelitian ini akan menganalisa pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus model yang dipapar UVB akut. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa krim ekstrak etanol kulit batang pohon nangka 4% dapat menghambat stres oksidatif sehingga terjadi

penurunan ekspresi melanin sebesar 18,13% pada epidermis kulit marmut melalui peningkatan kadar SOD-1 sebesar 2,41 mikro gram/mg, penurunan ekspresi 8OHdG sebesar 22,78%, ekspresi MCIR sebesar 27,33% dan kadar cAMP sebesar 0,37 mikro gram/mg dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena pada penelitian ini akan menganalisa pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus model yang dipapar UVB akut. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit buah Nangka pada rentang dosis 300 mg/kg hingga 500 mg/kg memiliki aktivitas sebagai obat analgetik walaupun masih membutuhkan penelitian lebih lanjut kedepannya. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena pada penelitian ini akan menganalisa pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus model yang dipapar UVB akut. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kombinasi ekstrak kulit batang nangka dan ekstrak delima memiliki aktivitas inhibitor tirosinase yang sinergis. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini, karena pada penelitian ini akan menganalisa pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tikus model yang dipapar UVB akut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Transforming growth factor- β*

Transforming Growth Factor adalah senyawa protein yang diturunkan dari keping darah selain EGF dan PDGF dan memiliki dua jenis subtype yaitu TGF alpha dan TGF beta.¹² Hormon ini bekerja bersama-sama dengan faktor pertumbuhan lainnya, seperti TGF- β , untuk memicu perubahan fenotipe pada sel, seperti transisi dari epitelial ke mesenkimal. Hal ini berkontribusi dalam proses onkogenesis serta proses penyembuhan.^{13,14} TGF- β memiliki efek stimulasi terhadap pertumbuhan pembuluh darah meskipun menghambat proliferasi sel endotelial. Selain itu, TGF- β juga bertindak sebagai senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag, sehingga di dalam sel tumor sering dijumpai rasio makrofag yang tinggi. Meskipun memiliki sifat immunosupresif, TGF- β mampu menghambat pertumbuhan kanker ovarium. Selain itu, bersama dengan faktor osteoinduksi, TGF- β juga merangsang pembentukan tulang.

2.1.1. Definisi TGF - β

Transforming Growth Factor β (TGF- β) adalah sitokin yang memiliki sifat pleiotropik dengan ukuran molekul sekitar 25 kDa. Aktivitas molekul TGF- β dijalankan melalui berbagai mode aksi seperti intrakrin, autokrin, parakrin, dan endokrin.¹⁵ Peran utama TGF- β melibatkan beberapa proses seluler seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan apoptosis yang penting untuk menjaga

keseimbangan dalam suatu jaringan. Pada keadaan normal, TGF- β membantu dalam mengatur apoptosis, yang esensial untuk diferensiasi dan regenerasi sel. Namun, jika kadar TGF- β meningkat, hal ini dapat menyebabkan kematian sel secara massal, yang pada sel hepar dapat mengakibatkan fibrosis dan sirosis. Pada tahap awal tumorigenesis, TGF- β berperan sebagai faktor supresor. Namun, aktivasi sinyal pengaktifan TGF- β yang berlebihan dapat menyebabkan resistensi terhadap efek supresif ini, yang pada akhirnya akan berkontribusi pada progresi tumor.^{16,17}

Pada kadar yang tinggi, TGF- β seringkali menghambat proliferasi sel secara reversibel. Beberapa stem cell dewasa tidak hanya mengekspresikan reseptor TGF- β pada permukaan sel mereka, tetapi juga mampu berada dalam keadaan diam (quiescent) selama berbulan-bulan. Keadaan diam di sini merujuk pada kemampuan stem cell untuk tetap tidak aktif dan kemudian kembali memasuki siklus sel sebagai respons terhadap kondisi lingkungan tertentu. Hal ini berbeda dengan kondisi penuaan sel dan diferensiasi sel secara umum. Kemampuan anggota TGF- β superfamily dalam menjaga keseimbangan antara proses proliferasi sel yang aktif dan siklus sel yang dapat dibalikkan menjadi hal yang penting untuk mempertahankan kemampuan stem cell dalam merespons dengan cepat terhadap perubahan fisiologi jaringan. Jalur sinyal TGF- β

mengendalikan proses biologi pada spektrum luas dari homeostasis sistem imun sampai self renewal.¹⁸

TGF- β 1 memainkan peranan vital dalam mengatur sistem kekebalan tubuh dan menunjukkan aktivitas yang beragam tergantung pada jenis sel yang terlibat. Sebagian besar sel imun atau leukosit menghasilkan TGF- β 1. Pada manusia, TGF- β 1 dikode oleh gen TGFB.¹⁹

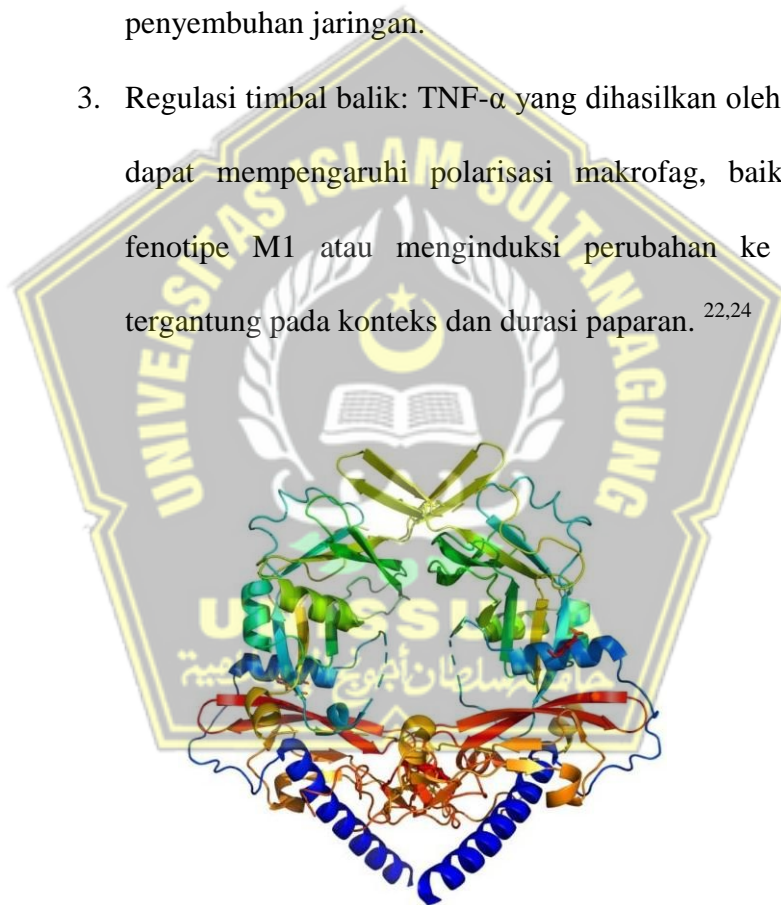
2.1.2. Aktivasi TGF - β

TGF- β adalah faktor yang dilepaskan oleh sel dan ekspresinya tergantung pada tipe sel, tingkat ekspresi, ligand, dan dosisnya. TGF- β memiliki sifat pleiotropik dan kadang-kadang bertentangan dengan efek seluler, baik dalam hal proliferasi, diferensiasi, migrasi, maupun kematian sel.^{18,20} Aktivitas biologis yang bersifat pleiotropik ini TGF- β berperan dalam mengatur berbagai proses seluler, termasuk kontrol proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis, morfogenesis, motilitas, invasi, homeostasis sel imun, dan produksi matriks ekstraseluler.^{21,22} TGF- β juga terlibat dalam mengatur dan mengubah beberapa proses jaringan dan sistemik, seperti perombakan matriks ekstraseluler, angiogenesis in vivo, immunosupresi, dan peradangan kronis.²³ Aksi dari TGF- β dipengaruhi oleh berbagai parameter, termasuk keberadaan sitokinsitokin lain. Terkadang, efek biologis TGF- β dapat dimodulasi oleh sitokin mitogenik yang bertindak untuk mengatasi

efek inhibisi TGF- β . Sintesis dan ekspresi reseptor TGF- β 1 terjadi di berbagai jenis sel, namun aktivitasnya bersifat parakrin dan terbatas pada area di mana TGF- β 1 diproduksi. Ekspresi TGF- β 1 dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti plasmin, matriks metalloproteinase, trombospondin-1, pH, dan ROS. Namun, aktivasi TGF- β 1 juga dikendalikan oleh integrin tertentu yang mampu berikatan dengan sekuen Arg-Gly-Asp pada Latency Associated Proteins (LAPs), menyebabkan perubahan konformasi dari bentuk tidak aktif ke bentuk prodomain. Oleh karena itu, baik agonis maupun antagonis dari faktor ekstraseluler yang terlarut dalam jaringan berkontribusi pada kompleksitas pengaturan akses ligan terhadap reseptornya. Sinyal ligan TGF- β diaktifkan oleh ikatan serin-treonin kinase transmembran, yang dikenal sebagai reseptor tipe I dan II. Pada vertebrata, terdapat 7 tipe reseptor tipe I (Activin-receptor like kinases /ALKs 1-7) dan 5 tipe reseptor tipe II. Ligan dari superfamili TGF berikatan secara spesifik dengan kompleks reseptor tipe I dan II. Ketika ligan aktif, sebuah reseptor tipe II memfosforilasi mitra reseptor tipe I-nya. Efektor inti kanonikal termasuk regulator Smad 1, 2, 3, 5, dan 8. Smad 2/3 difosforilasi oleh ALK4/5/7, sementara Smad 1/5/8 difosforilasi oleh ALK1/2/3/6. Smad inhibitor (Smad6 dan 7) dapat mengganggu jalur ini dengan berikatan langsung dengan R-Smad dan menghambat

modifikasi mereka²⁴ Keseimbangan antara makrofag M1 dan M2 sangat penting dalam regulasi inflamasi:

1. Fase akut: Dominasi makrofag M1 menghasilkan peningkatan TNF- α yang signifikan, memicu respon inflamasi akut.
2. Fase resolusi: Pergeseran ke arah dominasi makrofag M2 membantu mengurangi produksi TNF- α dan mempromosikan penyembuhan jaringan.
3. Regulasi timbal balik: TNF- α yang dihasilkan oleh makrofag M1 dapat mempengaruhi polarisasi makrofag, baik memperkuat fenotipe M1 atau menginduksi perubahan ke fenotipe M2 tergantung pada konteks dan durasi paparan.^{22,24}



Gambar 2.1. Ekspresi gen TGF- β

2.2. *Tumor necrosis Factor- α*

Istilah Tumor Necrosis Factor diberikan pada dua molekul, yaitu Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), yang merupakan faktor nekrosis yang berasal dari monosit, dan Tumor Necrosis Factor beta (TNF- β), yang

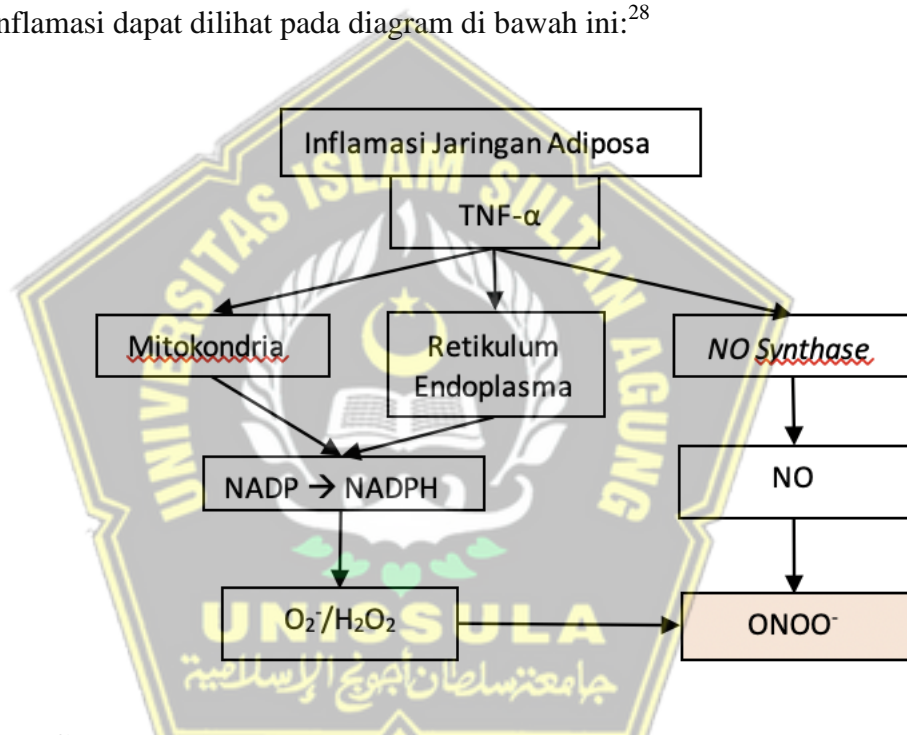
merupakan faktor nekrosis yang berasal dari limfosit.²⁵ TNF- α utamanya diproduksi oleh fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan oleh antigen, sel natural killer, dan sel mast, tetapi sumber utama TNF- α di paru-paru adalah makrofag alveolar. Stimulasi utama bagi makrofag untuk mengeluarkan TNF- α adalah lipopolisakarida dan IFN- γ .²⁶

Tumor Necrosis Factor alpha berperan sebagai mediator inflamasi bersama dengan stimulus dan sitokin lainnya seperti IL-1 β dan IL-6 melalui interaksinya dengan Toll Like Receptors (TLRs), reseptor IL-1, reseptor IL-6, dan reseptor TNF. Aktivasi dari reseptor ini dapat memicu jalur sinyal intraseluler, termasuk mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor kappa-B (NF- κ B), dan Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT), yang mengatur produksi sitokin-sitokin proinflamasi, kemokin, dan rekrutmen sel-sel imun menuju lokasi peradangan.²⁷

Tumor Necrosis Factor alpha memiliki beragam peran dalam proses inflamasi. Salah satunya adalah kemampuannya untuk meningkatkan peran protrombotik dan merangsang sel leukosit untuk mengeluarkan molekul adhesi. TNF alpha juga mengatur aktivitas makrofag dan sistem kekebalan tubuh di jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lainnya. Selain itu, TNF alpha berperan dalam respon imun terhadap virus, jamur, bakteri, dan parasite.²⁶

Selain terlibat secara langsung dalam proses inflamasi, TNF- α juga memiliki kemampuan untuk memicu produksi Reactive Oxygen Species

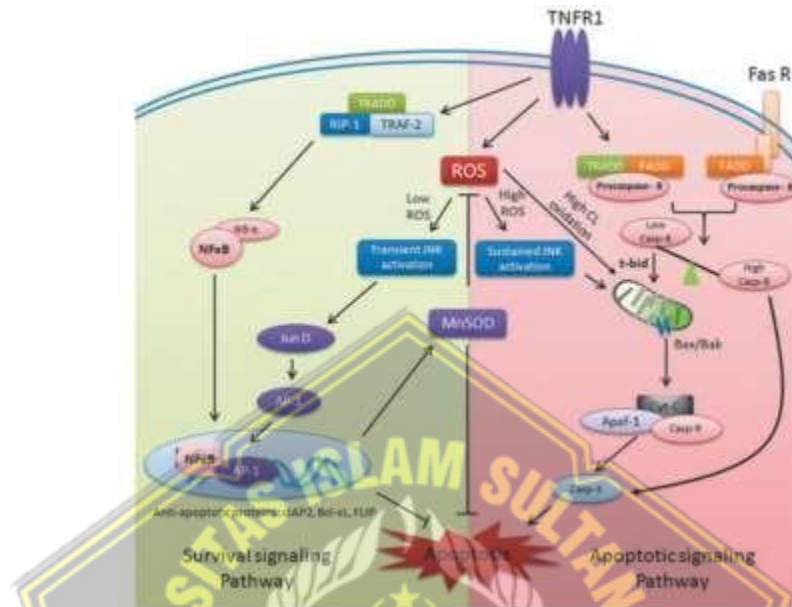
(ROS) melalui mitokondria sel endotel dan NAD(P)H pada membran plasma. Efek sitotoksik $\text{TNF-}\alpha$ terhadap mitokondria sel endotel disampaikan melalui perubahan fungsi mitokondria yang kemudian memicu produksi ROS di mitokondria, terutama di situs ubiquinone, dan merusak rantai mitokondria di kompleks III. Akibatnya, terjadi peningkatan produksi ROS di dalam mitokondria.²⁷ Mekanisme pembentukan ROS pada proses inflamasi dapat dilihat pada diagram di bawah ini.²⁸



Gambar 2.2. Mekanisme Pembentukan ROS dan RNS Saat Proses Inflamasi

Tumor Necrosis Factor alpha memiliki kemampuan untuk menginduksi kematian sel melalui pengikatannya dengan TNF receptor 1 (TNFR1) dan TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) serta TRAIL receptor 2, yang melibatkan serangkaian kaskade intraselular. Namun, meskipun demikian, $\text{TNF-}\alpha$ tidak selalu berhasil

memicu apoptosis pada semua jenis sel karena terdapat dua mekanisme pertahanan sel di dalamnya yang melindungi sel dari kematian sel.²⁹



Gambar 2.3. Mekanisme Apoptosis Sel dan Mekanisme Pertahanan Sel

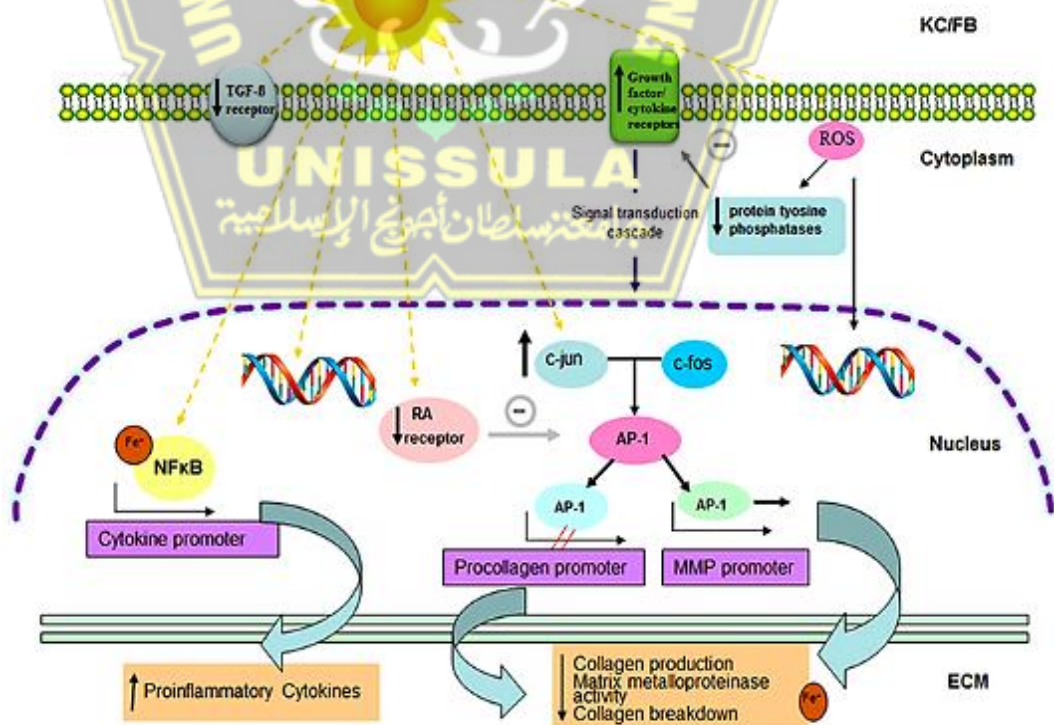
2.3. *Photodamage*

Photodamage atau penuaan kronologis yang terjadi tergantung pada tingkat paparan sinar matahari dan jumlah melanin pada kulit setiap individu.³⁰ Berdasarkan panjang gelombangnya, sinar ultraviolet dapat dibagi menjadi tiga jenis: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), dan UVC (200-275 nm). Sinar UVC umumnya diserap oleh lapisan ozon dan jarang mencapai permukaan bumi, sementara UVA dan UVB dapat mencapai dermis dan epidermis kulit.³¹ UVB lebih aktif secara biologis daripada UVA, UVB yang dianggap sebagai penyebab utama dari *photodamage*.³² Tanda klinis yang sering terlihat pada kondisi ini meliputi keriput, pigmentasi, kulit kasar, kulit kering, dan telangiectasis. Perubahan ini biasanya terjadi pada area tubuh yang sering terpapar sinar matahari,

seperti wajah, leher, tangan, lengan, dan punggung kaki. Paparan sinar UVB dapat merangsang produksi berbagai jenis Reactive Oxygen Species (ROS), termasuk NO. Peningkatan kadar NO setelah 24 jam paparan UVB dapat menyebabkan lesi pada kulit karena peroksida lipid, pembentukan nitrotirosine, dan penurunan proliferasi sel.³⁰ Paparan sinar matahari berlebihan juga dapat menyebabkan peningkatan ROS yang memicu kaskade transduksi sinyal. MMP-1, yang disekresikan oleh fibroblas dan keratinosit sebagai respons terhadap stres oksidatif dari paparan sinar matahari, adalah salah satu contohnya.

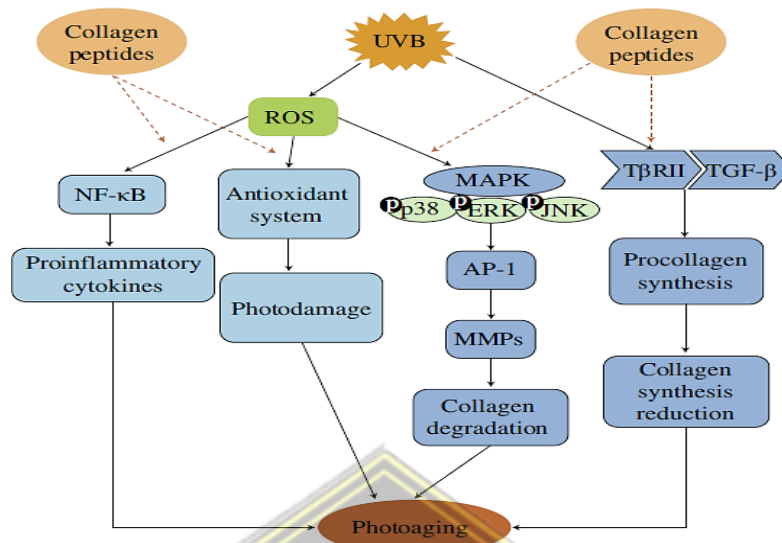
Lapisan dermis sebagian besar terdiri dari jaringan ikat yang memiliki peran utama dalam memberikan lapisan yang kuat dan fleksibel pada kulit. Jaringan ikat dermal mengandung kolagen dan elastin. Kolagen merupakan volume terbesar kulit dan memberikan kekuatan tarikan, sedangkan elastin berkontribusi dalam elastisitas dan ketahanan. Molekul kolagen saling terikat satu sama lain sehingga tersusun tumpang tindih menjadi serat kolagen yang kuat yang memberi kekuatan tarikan pada jaringan tersebut. Kolagen utama yang terlibat dalam arsitektur dan fisiologi kulit adalah tipe pembentuk fibril, terutama Tipe I dan Tipe III. Pada kulit usia muda, kolagen tipe I terdiri dari 80 %. Tipe III umumnya ditemukan bersama Tipe I dan biasanya mewakili sekitar 15% kolagen kulit. Kolagen tipe I, prototipe dan juga anggota yang paling melimpah, memiliki struktur heliks rangkap tiga rantai panjang, terdiri dari heterotrimer dari dua rantai $\alpha 1$ yang identik dan satu rantai $\alpha 2$. Kolagen terus-menerus disintesis, didalam matrik

ekstraseluler akan didegradasi oleh enzim, khususnya MMP. Pergantian kolagen ini cepat selama perkembangan dan kemudian diam selama tahun-tahun dewasa tetapi meningkat lagi di kemudian hari untuk mengkompensasi kerusakan kumulatif yang terkait dengan penuaan kronologis dan photoaging. Saat kadar kolagen mulai menurun, struktur kolagen menjadi lebih rapuh yang menyebabkan melemahnya dukungan struktural kulit. Kulit kehilangan volume dan kekencangan dan mulai menipis dan berkerut.³³ Dua regulator utama dalam proses produksi kolagen yaitu TGF- β dan AP-1. TGF- β memiliki peran dalam meningkatkan produksi kolagen, sedangkan AP-1 menghambat produksi dan memecah kolagen. Keduanya dipengaruhi oleh kadar ROS dalam tubuh.



Gambar 2.4. Mekanisme *photodamage*³²

Reactive Oxygen Species (ROS) yang dipicu oleh radiasi UVB juga dapat memicu transduksi sinyal dan mengaktifkan sitokin-sitokin inflamasi, yang kemudian dapat mengaktifasi protein kinase, termasuk MMP.³⁴ Aktivasi MMP, atau yang dikenal sebagai matrix metalloproteinase, dapat menghasilkan degradasi kolagen dan jaringan serat elastis di dermis. Secara khusus, MMP-1 dapat mengurai susunan protein kolagen tipe I dan III di dermis, sehingga photodamage dapat menyebabkan manifestasi seperti kerutan.³⁵ Selama proses pertumbuhan dan perkembangan sel, TGF- β diaktifkan. TGF- β berinteraksi dengan reseptornya dan mengatur protein reseptor Smad (R-Smad) seperti Smad2 dan Smad3. Sinyal kemudian diteruskan ke dalam sel dan meningkatkan sintesis prokolagen tipe I. Namun, karena adanya ROS yang diinduksi oleh radiasi UVB, penempelan TGF- β pada reseptornya menjadi tidak stabil dan lemah. Selain itu, ekspresi protein Smad7 meningkat karena adanya ROS, yang kemudian berikatan dengan reseptor R-Smad dan TGF- β . Akibatnya sinyal transduksi sintesis prokolagen tipe I akan terhambat.³⁶



Gambar 2.5. Sintesis collagen pada photoaging³⁷

Adanya peningkatan ROS mengaktifkan jalur MAPK. MAPK merupakan keluarga enzim yang terdiri dari tiga jenis yaitu ERK, c-Jun, c-Fos, dan p38 kinase. Aktivasi jalur MAPK melalui reseptor tirosin kinase mengaktifasi ekspresi c-Jun dan c-Fos akan membentuk AP-1 yang berperan penting dalam regulasi transkripsi MMP-1. Selain itu AP-1 juga berperan dalam menghambat sinyal TGF-beta yang merupakan regulator mayor produksi prokolagen tipe 1 kulit. Terganggunya jalur TGF-beta mengarahkan pada penurunan sintesis kolagen. Factor lain yang teraktivasi karena radiasi sinar UV yaitu Nf-kB akan meregulasi ekspresi growth factor, kemokin, sitokin dan molekul sel adhesi. Aktivasi NF-kB mengakibatkan up regulasi dari MMP-1.³⁸ Kerusakan kulit diikuti oleh perbaikan kulit namun terjadi secara tidak sempurna, akumulasi jaringan parut menghasilkan defisit integritas struktural dari dermis. AP-1 menyebabkan peningkatan kerusakan kolagen, menjadi tinggi dan tetap

tinggi kadarnya dalam 24 jam setelah paparan sinar radiasi. Penurunan sintesis prokolagen terjadi dalam waktu 8 jam setelah paparan sinar UV. Akumulasi dari paparan sinar UV akan membentuk *solar scar* yang akan bermanifestasi sebagai kerutan. Pemecahan kolagen selalu diikuti dengan sintesis dan perbaikan, namun hampir semua proses penyembuhan luka menyisakan bekas yang secara klinis tidak tampak. Bersama dengan bertambahnya usia dan faktor eksternal, terjadi penumpukan *solar scar* dan membentuk kerutan.³⁹

Prokolagen tipe I merupakan precursor dari kolagen tipe I yang merupakan salah satu penyusun struktur kulit. TGF- β /Smad sangat penting untuk sintesis kolagen tipe I di dermis. TGF- β merupakan sitokin yang penting untuk meregulasi sintesis matriks ekstraseluler termasuk kolagen, elastin dan fibronectin. TGF- β memiliki 2 tipe reseptor, yaitu reseptor TGF- β tipe I (T β RI) dan reseptor TGF- β tipe 2 (T β RII). TGF- β Bersama dengan Smad akan membentuk suatu pathway yang mengatur regulasi kolagen tipe I. Pertama TGF- β akan menempel pada T β RII yang menghasilkan fosforilasi reseptor yang ditransduksi T β RI, yang dapat mengaktifkan Smad2 dan Smad3. Setelah aktivasi Smad2 dan Smad3 bersama Smad4 akan membentuk suatu kompleks yang akan dibawa ke nucleus dan mengikat promotor transkripsi prokolagen untuk mensintesis kolagen.³⁷ Namun karena adanya ROS yang disebabkan oleh radiasi UVB, penempelan TGF- β pada reseptor T β RII menjadi tidak stabil dan melemah.³⁶ Selain itu dengan adanya ROS ekspresi protein Smad7 akan meningkat, kemudian menempel

pada reseptor T β RI dan mengganggu fosfolirasi Smad2 dan Smad3. Akibatnya sinyal transduksi sintesis prokolagen tipe I akan terhambat.³⁷

2.4. Pohon Nangka

Nangka (*Artocarpus heterophyllus Lamk*) merupakan salah satu buah daerah tropis yang populer di Indonesia. Nangka termasuk dalam family *Moraceae*, yaitu buah dengan ukuran besar dan beraroma harum tajam dengan rasa yang manis.⁴⁰ Tanaman ini memiliki ciri-ciri berbentuk pohon dengan tinggi 10-30m, bergetah putih dan ranting muda gundul. Daun penumpu yang membungkus tunas daun muda, Panjang 1-5cm, terkadang hingga 8cm. Untuk panjang tangkai daun mencapai 3cm. Helaihan bercuping tiga saat masih muda dan jorong atau terkadang hamper membundar seperti telur sungsang saat sudah dewasa dengan Panjang 4-15cm dan lebar 2-12cm. Pangkal daun berbentuk membundar atau membaji dengan tepi rata dan ujung tumpul hingga meruncing pendek. Bunga muncul secara soliter dari batang atau cabang. Bunga jantan memiliki panjang tangkai 1-5,5cm dengan rangkaian bunga berbentuk silindris atau mendekati jorong yang berukuran panjang 2,5-7cm. Sedangkan bunga betina memiliki tangkai dengan panjang 3-10cm dan rangkaian bunga berbentuk jorong hingga silindris.⁴¹



Gambar 2.6. Nangka (*Artocarpus heterophyllus Lamk*)

2.4.1. Manfaat Pohon Nangka

Seluruh bagian dari pohon nangka memiliki banyak manfaat diantaranya yaituberkhasiat sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antidiuretic, dan imunomodulator.⁴²

2.4.2. Kandungan Pohon Nangka

Nangka (*Artocarpus heterophyllus Lamk*) memiliki kandungan flavone eral, morin, dihydromorin, cynomacurin, arcarpin, isoartocarpin, cyloartocarpin, artocarpesin, oxydihydroartocarpesin, artocarpetin, norartocarpetin, cycloartinone, dan artocarpanone. Kelembaban yang dihasilkan oleh inti kayu nangka (6,7%), glukosida (38,0%), lipid (0,7%), protein (1,7%), dan selulosa (59,0%).⁴³ Dibandingkan dengan jenis *Artocarpus* lainnya jenis

Artocarpus heterophyllus memiliki aktivitas sebagai penghambat tirosinase yang paling besar dengan mengambil bagian kulit batangnya. Senyawa bioaktif yang didapat dari ekstrak kulit batang nangka berupa senyawa polifenol yang berfungsi sebagai agen depigmentasi.¹⁰

Biji buah nangka mengandung banyak mineral dan lemak.⁴⁴ Biji buah nangka juga mengandung karbohidrat tinggi yang menjadi sumber energy untuk hewan jika dimasukkan ke dalam asupan diet hewan.⁴⁵ Pada kulit akar mengandung beberapa senyawa flavonoid diantaranya yaitu 5,2- dihidroksi, 7-4-dimetoksiflavanon, 2,4,6-trioksigenasiflavanon, heteroflavan A dan B, sikloartenon, artonin X, β -sitosterol, artonin D, 5-hidroksi, 7,2,4,6-tetrametoksiflavanon, artonin C, asam ursolat, 8-(γ , γ -dimetilalil)-5,2,4-trihidroksi-7-metoksiflavanon, heteroflavanon C, sikloartokarpin A, 9-hidroksitridesil dokosanoat, heteropilol, betulin, dan asam betulinat.¹⁰

Berdasarkan hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry* GC-MS pada ekstrak kulit batang pohon nangka didapatkan senyawa: *Hexadecanoic acid ethyl ester* yang dikenal juga dengan nama Ester Asam Palmitate, Asam Palmitat, yang mempunyai aktivitas sebagai Antioksidan *Hypocholesterolemic*, *Androgenic*, *Hemolytic 5-alpha reductase inhibitor*.

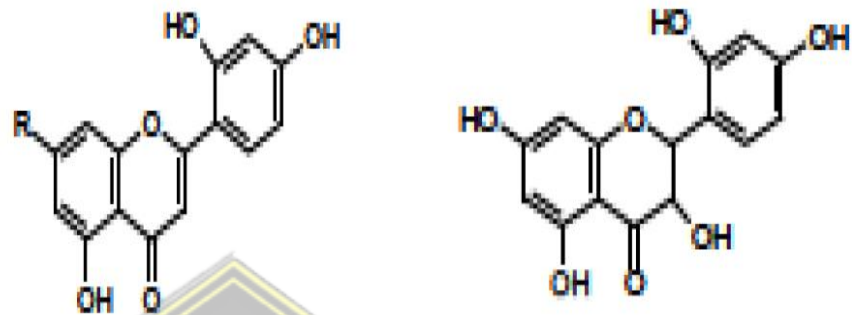
1. *Estra-1,3,5(10)-trien-17-beta-ol*, termasuk kedalam golongan steroid yang mempunyai efek Antioksidan, Antibakteri, dan Anti inflamasi yang mempunyai mekanisme kerja menurunkan jumlah melanin dengan cara mengoksidasi enzim tirosinase secara enzimatik menjadi produk yang sitotoksik pada melanosit sehingga terjadi degenerasi/ kerusakan sel-sel pigmen sehingga dapat terjadi depigmentasi.
2. *Ethyl tridecanoate*, yang memiliki efek Anti Virus, Antioksidan, dan Anti inflamasi.
3. *Linoleic acid ethyl ester*, yang mempunyai efektivitas sebagai *Hypocholesterolemia*, *Anti Acne*, *Anti androgenic 5 alpha reduktase inhibitor*, degradasi enzim tirosinase dan menurunkan kadar tirosinase. Senyawa ini juga mempunyai efek sebagai tabir surya (*sunscreen*) dengan cara berikatan dengan melanin menjadi lipomelanin yang menyerap radiasi sinar UV, sehingga dapat menghambat peningkatan jumlah melanin.
4. *Ethyl Oleate*, atau nama lainnya *Oleic acid ethyl ester* mempunyai aktivitas sebagai *Food additive*, *Lubricasi*, *Solvent*.
5. *Gamma Sitosterol*, termasuk kedalam golongan steroid dan mempunyai aktivitas Anti mikroba, Anti kanker, dan Anti inflamasi serta mempunyai mekanisme kerja terhadap penurunan jumlah melanin dengan cara mengoksidasi enzim tirosinase secara enzimatik menjadi produk yang sitotoksik pada melanosit

sehingga terjadi degenerasi/ perusakan sel-sel pigmen sehingga dapat terjadi depigmentasi.⁴⁶

Kandungan kimia dalam kayu adalah morin, sianomaklurin (zat samak), flavon, dan tanin. Selain itu, di kulit kayunya juga terdapat senyawa flavonoid yang baru, yakni morusin, artonin E, artokarpin, sikloartobilosanton, dan artonol B.⁴⁷ Bioaktivitas senyawa flavonoid tersebut terbukti secara empirik sebagai antikanker, antivirus, antiinflamasi, diuretik dan antihipertensi.

Flavonoid digunakan di beberapa terapi medis alami untuk berbagai efek bermanfaatnya, termasuk tindakan antikanker dan anti-inflamasi, serta untuk perlindungan terhadap radiasi UV. Berbagai spesies *Artocarpus* adalah sumber berlimpah flavonoid dan turunan yang diprenilasi dan karenanya telah diperiksa secara fitokimia dan biologis untuk antijamur, antiplatelet, antiinflamasi, dan aktivitas pemulungan radikal. Senyawa polifenol (flavonoid) yang merupakan kelompok terbesar mempunyai efek dapat menghambat proses melanogenesis sebagai tyrosinase inhibitory. Polifenol juga mempunyai efek melindungi kulit dari radiasi UV, efek anti inflamasi, imunomodulator, memperbaiki DNA yang rusak, dan memperbaiki fungsi sel, dapat pula sebagai fotoprotektif.⁴⁸ Asam lemak rantai panjang serta steroid, mempunyai mekanisme terjadinya penurunan jumlah melanin dengan cara mengoksidasi enzim tirosinase secara enzimatik menjadi produk yang bersifat

toksik pada melanosit sehingga terjadi degenerasi/perusakan sel-sel pigmen dan dapat terjadi depigmentasi.



Gambar 2.7. Rumus senyawa aktif dalam kulit batang nangka⁴⁸

2.4.3. Efek Fotoproteksi Ekstrak Kulit Batang Nangka

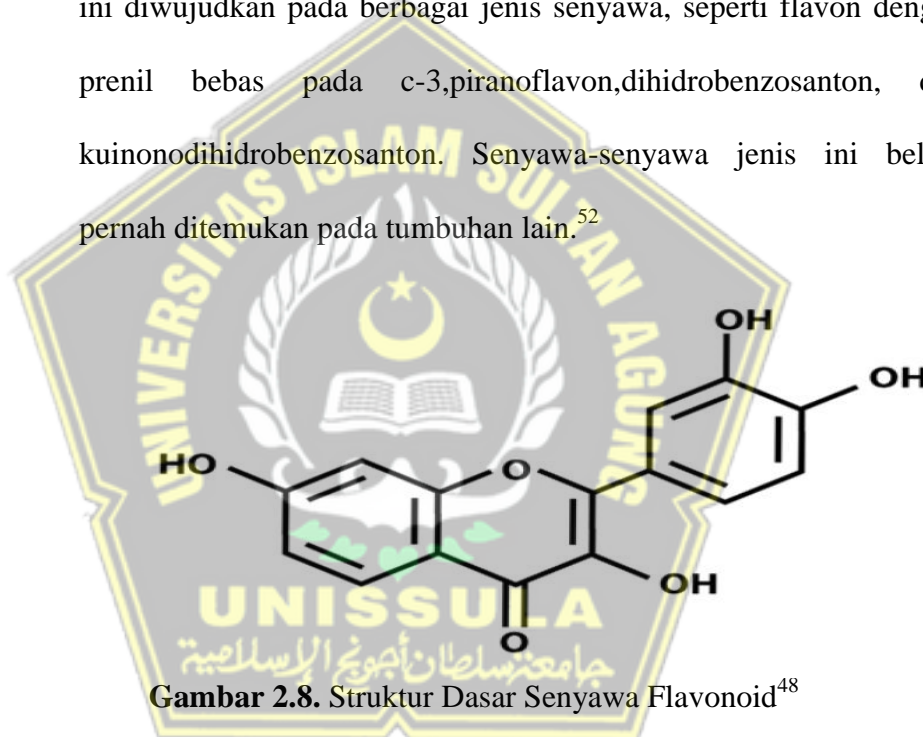
1. Senyawa antioksidan yang terkandung akan menyumbang atom hidrogen atau elektron dan mengubah bentuk radikal bebas menjadi lebih stabil.⁴⁹
2. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidatif flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam.⁵⁰

Flavonoid berinteraksi pada jalur MAPK dengan cara menurunkan reaksi oksidatif serta menunjukkan inhibisi pada kaskade extracelluler signal related kinase (ERK 1/2) dan c-Jun amino terminal kinase (JNK 1/2/3). Flavonoid mensupresi transkripsi TNF-

α dengan menghambat fosforilasi dan aktivasi jalur JNK/SAPK serta memblok produksi TNF- α melalui inhibisi fosforilasi ERK $\frac{1}{2}$ dan aktivasi p38 MAPK.⁵¹

Flavonoid yang dihasilkan oleh *Artocarpus* ialah adanya substituent isoprenil pada C-3 dan pola 2',4'-dioksigenasi atau 2',4',5'-trioksigenasi pada cincin B dari kerangka dasar flavon. Ciri ini diwujudkan pada berbagai jenis senyawa, seperti flavon dengan prenil bebas pada c-3,piranoflavon,dihidrobensosanton, dan kuinonodihidrobensosanton. Senyawa-senyawa jenis ini belum pernah ditemukan pada tumbuhan lain.⁵²



Gambar 2.8. Struktur Dasar Senyawa Flavonoid⁴⁸

2.4.4. Sistem Pemberian Obat Melalui Kulit

Bentuk sediaan krim merupakan bentuk sediaan yang paling banyak digunakan dalam system pemberian obat maupun kosmetik pada kulit. Preparat yang digunakan pada kulit antara lain untuk efek fisik, yaitu sebagai pelindung kulit, pelican, pelembut,zat pengering,dan lain-lain atau untuk efek khususdari bahan obat yang ada.⁵³

Penetrasi obat setelah pemakaian topical pada kulit yang utuh sebagian besar melalui lapisan epidermis, dan sebagian kecil lainnya melalui dinding folikel rambut, kelenjar keringat atau kelenjar lemak atau antara sel-sel selaput tanduk.¹⁰ Absorpsi perkutan suatu obat pada umumnya disebabkan oleh penetrasi obat langsung melalui stratum korneum yang memiliki ketebalan 10–15 μm . Stratum korneum terdiri dari kurang lebih 40% protein (pada umumnya keratin) dan 40% air dan lemak terutama trigliserida, asam lemak bebas, kolesterol, dan fosfat lemak. Komponen lemak pada stratum korneum menyebabkan rendahnya penetrasi obat melalui stratum korneum. Suatu obat yang dapat menembus stratum korneum kemudian dapat terus melalui jaringan epidermis yang lebih dalam dan masuk ke dermis apabila obat mencapai pembuluh darah maka obat tersebut dapat diabsorpsi ke dalam sirkulasi sistemik.⁵⁴

Stratum korneum sebagai jaringan keratin berlaku sebagai membran semi permeabel, dan molekul obat mempenetrasi dengan cara difusi pasif. Jumlah obat yang dapat melalui berbagai lapisan kulit tergantung pada konsentrasi obat, sifat kelarutan dalam air, dan koefisien partisi obat tersebut dalam minyak atau air.⁴⁶ Difusi molekul obat pada lapisan-lapisan kulit dapat terjadi melalui penetrasi transelular (menyeberangi sel), penetrasi interselular (antarsel), dan penetrasi transapendageal yaitu melalui folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar lemak, dan pilo sebaceus.⁴⁸

Faktor-faktor yang mempengaruhi absorpsi perkutan antara lain:

1. Obat yang dicampurkan dalam pembawa tertentu harus bersatu pada permukaan kulit dalam konsentrasi yang cukup
2. Luas permukaan kulit yang diberi obat topikal, konsentrasi obat, koefisien partisi
3. Pembawa yang meningkatkan jumlah uap air yang ditahan kulit umumnya cenderung baik bagi absorpsi pelarut obat.
4. Hidrasi pada stratum corneum dapat meningkatkan penetrasi obat
5. Lamanya waktu pemakaian obat

Pada umumnya, semakin lama waktu pemakaian obat menempel pada kulit, semakin banyak kemungkinan obat terabsorpsi.

2.4.5. Krim

Krim adalah sediaan setengah padat, berupa emulsi yang mengandung air tidak kurang dari 60% dan dimaksudkan untuk pemakaian luar. Krim ada dua tipe yakni krim tipe M/A dan tipe A/M. Krim yang dapat dicuci dengan air (M/A), ditujukan untuk penggunaan kosmetika dan estetika. Sifat umum sediaan krim ialah mampu melekat pada permukaan tempat pemakaian dalam waktu yang cukup lama sebelum sediaan ini dicuci atau dihilangkan. Krim dapat memberikan efek mengkilap, berminyak, melembapkan, dan mudah tersebar merata, mudah berpenetrasi pada kulit, mudah/sulit diusap, mudah/sulit dicuci air.

Krim hidrofilik mengandung sejumlah besar air dalam fase eksternalnya, atau yang disebut dengan minyak dalam air, contohnya *vanishing* krim.⁵⁵ *Vanishing* krim mengandung air dalam presentase besar dan asam *stearat*, sehingga saat digunakan air akan menguap meninggalkan sisa berupa selaput *stearat*. Krim hidrofobik mengandung sejumlah besar minyak dalam fase eksternalnya, atau yang disebut dengan air dalam minyak, contohnya adalah *cold* krim. *Cold* krim adalah emulsi air dalam minyak setengah padat, dibuat dengan lilin etil ester, lilin putih, minyak mineral, natrium borat dan air murni. *Cold* krim digunakan sebagai emolien dan bahan dasar salep.⁵⁶

Pemilihan bentuk sediaan krim ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan bentuk sediaan lainnya seperti penyebarannya yang merata dan mudah untuk dibersihkan, khususnya krim emulsi minyak dalam air.⁵⁷ Pertimbangan yang terpenting bagi sediaan krim dalam bidang farmasi dan kosmetik adalah stabilitas dari produk jadi. Sediaan kosmetik yang stabil masih berada dalam batas yang dapat diterima selama periode penyimpanan dan penggunaan, yaitu sifat dan karakteristiknya sama dengan saat dibuat.⁵⁸

2.5. Hubungan Ekstrak Kulit Nangka terhadap Ekspresi TNF-a dan TGF-B

Iradasi UVB akut pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS.⁵⁹ Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet (1O_2), anion superoksida (O_2^-), hidrogen

peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($OH\cdot$) yang mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor kappa beta* (NF-kB).⁶⁰ Aktivasi NF-kB menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α sehingga menyebabkan *photodamage*. Peningkatan kadar ROS juga dapat menginduksi aktivasi TGF-B sehingga dapat mengaktifkan jalur SAMD2/3 dan PI3K yang akan menginduksi translokasi NF-kB. Translokasi NF-kB ini akan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi pensinyalan inflamasi seperti TNF-a dan menyebabkan *photodamage*.

Senyawa flavonoid dapat menghambat terjadinya *photodamage*⁶¹. Senyawa fenolik dari kulit batang nangka memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, antiproliferasi, antimutagenik, antimikroba, dan antikarsinogenik. Senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat penetrasi radiasi ke dalam kulit, mengurangi reaksi peradangan, dan mengatasi stres oksidatif pada fibroblas.⁶² Mekanisme kerja senyawa fenolik melibatkan kemampuan gugus fenol untuk menangkap radikal bebas dengan memberikan atom hidrogen melalui proses transfer elektron, sehingga fenol berubah menjadi radikal fenoksil. Radikal fenoksil yang dihasilkan dari reaksi antara fenol dan radikal bebas kemudian menstabilkan dirinya sendiri melalui efek resonansi. Oleh karena itu, derivat dari fenol sering disebut sebagai donor hidrogen yang efektif yang dapat menghambat reaksi yang diinduksi oleh radikal bebas. Sebagai akibatnya, senyawa fenolik dianggap sebagai inhibitor radikal.

Senyawa tersebut dapat mencegah penetrasi radiasi ke dalam kulit dan mengurangi reaksi peradangan serta stress oksidatif pada fibroblast.⁶³ Senyawa fenolik memiliki struktur cincin aromatic dengan satu atau lebih gugus hidroksil sehingga aktivitas antioksidannya dapat bertindak sebagai reduktor dengan menyumbangkan elektron dan melindungi sel terhadap ROS.⁶⁴ Flavonoid berperan sebagai scavenger ROS, yang bertanggung jawab dalam efek antioksidan adalah gugus hidroksil pada posisi 3 dari cincin C dan posisi 3', 4', 5' dari cincin B⁶⁵. Pemberian flavonoid dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi dengan menurunkan aktivasi factor transkripsi Nf-kB.⁶⁶



BAB III

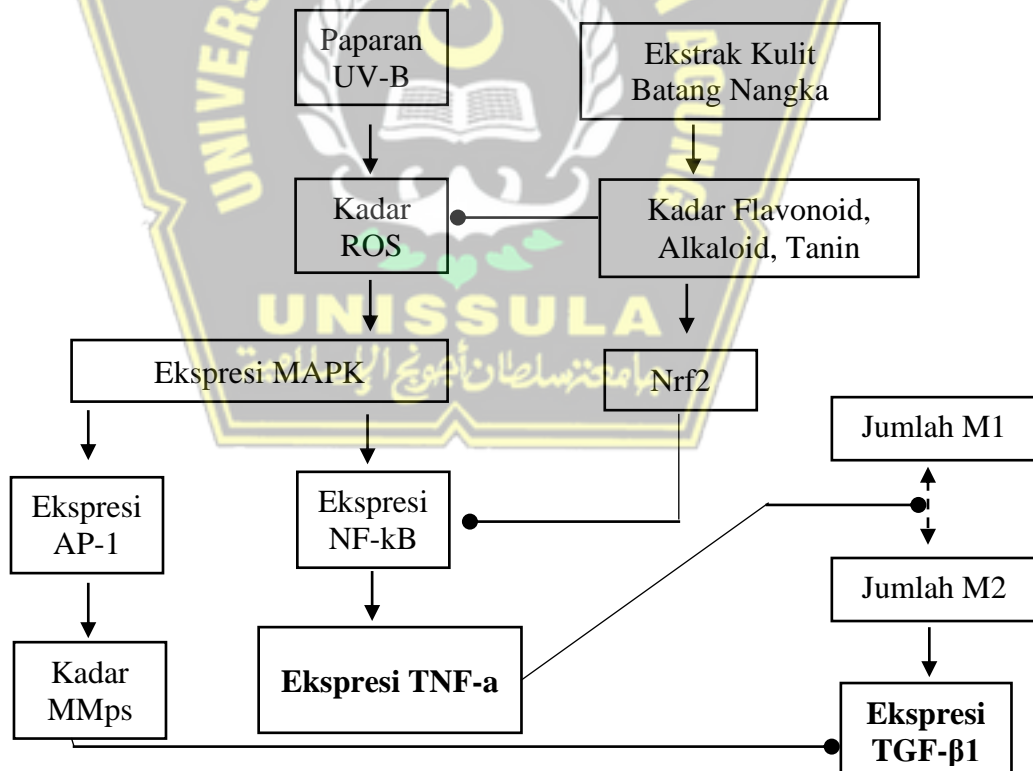
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Radiasi UVB merupakan bahaya yang signifikan terhadap kulit karena tindakan karsinogenik langsung dan tindakan immunosupresifnya, yang sebagian besar disebabkan oleh komponen ultraviolet B (UVB). Sinar UV akan langsung diterima oleh kulit dan akan menyebabkan terjadinya reaksi stress oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar ROS. Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($1O_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH.) yang mengaktifkan mitogen-activated protein kinase (MAPK) 55. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari extracellular signal-regulated kinases (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos dan c-Jun. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang menghambat TGF- β . Aktivasi AP-1 akibat ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF- κ B. Ekspresi NfFkB memproduksi koenzim dan memicu sekresi sitokin inflamasi salah satunya TNF-a yang mengakibatkan overekspresi MMPs sehingga menyebabkan *photodamage*.

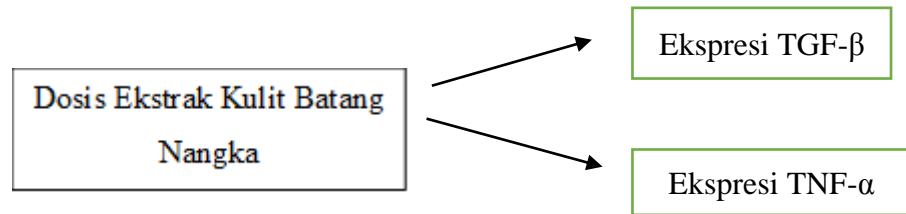
Kulit batang nangka diketahui mengandung beberapa zat aktif yang berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. Ekstrak etanol kulit nangka ini juga menurunkan kadar IL-1B dan TNF-a secara tergantung dosis.⁷

Flavonoid dapat menghambat produksi ROS pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah terjadinya *photodamage*. Selain itu penghambatan ROS juga mampu menurunkan produksi molekul-molekul inflamasi dan memicu proses polarisasi M1 menjadi M2 yang mampu mensekresikan TGF- β 1. Makrofag M2 dapat berubah menjadi fenotipe M1 jika terpapar sinyal pro-inflamasi yang kuat, sehingga berpotensi meningkatkan produksi TNF- α . Pergeseran ke arah dominasi makrofag M2 membantu mengurangi produksi TNF- α dan mempromosikan penyembuhan jaringan dengan menginduksi TGF- β 1.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

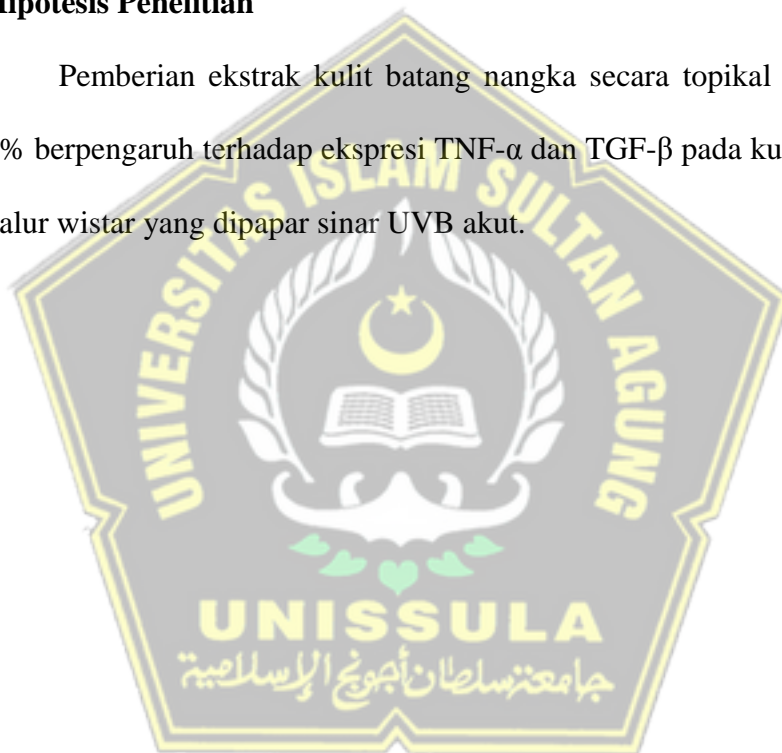
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak kulit batang nangka secara topikal dosis 2% dan 4% berpengaruh terhadap ekspresi TNF- α dan TGF- β pada kulit tikus jantan galur wistar yang dipapar sinar UVB akut.

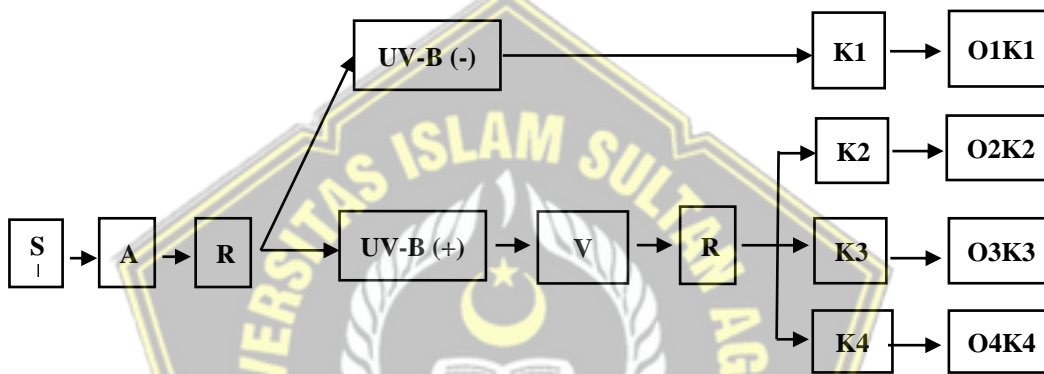


BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *randomized post-test only control group*, dengan menggunakan hewan coba tikus jantan galur wistar sebagai objek penelitian.



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan :

- P : Populasi Penelitian
- S : Sampel Penelitian (Tikus) Sehat
- A : Adaptasi
- V : Validasi
- R : Randomisasi

Perlakuan :

- K1 : Kelompok kontrol normal yang diberi pakan *standard* tanpa diberi paparan sinar UVB akut selama 5 hari, selanjutnya disebut kelompok kontrol positif.
- K2 : Kelompok kontrol negatif yang diberi pakan *standard* dan diberi paparan sinar UVB akut dan dioleskan bahan dasar krim (plasebo) selama 5 hari, selanjutnya disebut kelompok kontrol negatif
- K3 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak batang angka 2%, dipapar sinar UVB selama 5 hari, selanjutnya disebut kelompok 3
- K4 : Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak batang angka 4%, dipapar sinar UVB selama 5 hari, selanjutnya disebut kelompok 4
- O : Observasi

4.2. Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi penelitian yaitu tikus jantan galur wistar yang berada di laboratorium UNS. Tikus yang digunakan adalah tikus wistar jantan berumur 3 bulan dengan berat badan antara 200-250 gram. Tikus dipelihara dengan pakan pellet yang terstandar dan air minum berupa akuades suhu ruangan pemeliharaan berkisar 28° – 32° C dengan ventilasi dan ruangan yang cukup. Tikus kemudian dilakukan adaptasi selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan.

4.2.2. Teknik Pengambilan Sampel

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus jantan Wistar
- b. Tikus dalam keadaan aktif, sehat, tingkah laku dan aktifitas normal
- c. Umur 3 bulan
- d. Berat badan 200-250 gram

4.2.2.2. Kriteria Drop out

- a. Tikus mati
- b. Tikus menjadi sakit selama perlakuan

4.2.3. Jumlah Sampel

Besar sampel menurut WHO, perkelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% (1ekor). Sampel kemudian diambil secara acak

menggunakan cara *random sampling allocation* kemudian dibagi kedalam 4 kelompok. Jumlah keseluruhan sampel tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 26 ekor.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

- a. Variabel bebas : Krim ekstrak kulit pohon nangka
- b. Variabel terikat : TNF α dan TGF β
- c. Variabel prakondisi : Sinar UVB

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Dosis Krim Ekstrak Batang Nangka

Krim ekstrak kulit batang nangka adalah krim yang mengandung ekstrak kulit batang nangka yang dilarutkan dalam sediaan topikal dalam bentuk krim mengandung dosis 2% ekstrak kulit batang nangka dan 4% ekstrak kulit batang nangka. Pengukuran dilakukan di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Unissula.

Skala : Ratio

4.3.2.2. Ekspresi TNF- α

Sampel jaringan kulit di area penyinaran diambil dan dibuat embedding dalam paraffin. Sampel paraffin blok dipotong dan dilakukan analisis ekspresi protein dengan menggunakan imunohistokimia (IHC). Sampel yang

membentuk warna coklat dinyatakan positif terekspresi TNF- α dan dihitung luas area positif (area antar sel yang berwarna coklat) dan dibandingkan dengan total luas area pada lapangan pandang, analisis dihitung dengan imageJ. Pengukuran dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM.

Skala: Ratio.

4.3.2.3. Ekspresi TGF β

Sampel jaringan kulit di area penyinaran diambil dan dibuat embedding dalam paraffin. Sampel paraffin blok dipotong dan dilakukan analisis ekspresi protein dengan menggunakan imunohistokimia (IHC). Sampel yang membentuk warna coklat dinyatakan positif terekspresi TGF- β dan di hitung jumlah positif area yang berwarna coklat dan dibandingkan dengan total luas area pada lima lapang pandang, analisis dihitung dengan imageJ. Pengukuran dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran UGM.

Skala: Ratio.

4.3.2.4. Sinar UVB

Sinar UVB adalah sinar yang berasal dari lampu UVB *Narrowband* TL-F72-100W/12 dengan besar dosis radiasi yang dapat diukur dengan UV meter. UV light (broadband

dengan peak emission 302 nm) dengan minimal erythema dose (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 5 hari⁶⁷. Pengukuran dilakukan di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Unissula.

Skala: Ratio.

4.4. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan dasar basis krim, krim ekstrak kulit batang nangka 2% dan 4%, lampu UVB, kit TNF α , kit TGF β .

4.5. Peralatan Penelitian

1. kandang tikus
2. Tempat minum merk Onyx
3. Lampu ultra violet B merk Philips TL-F72-100W/12
4. Alat cukur merk Goal
5. Timbangan digital merk Tanita
6. Peralatan bedah seperti gunting anatomis untuk bedah, skalpel merk B Braun
7. Peralatan untuk membuat sediaan histopatologi seperti mikrotom, gelas objek dan gelas penutup merk Yena.
8. Mikroskop merk Olympus Cx40
9. Kamera merk Sony
10. Penggaris besi merk Star

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Perolehan *Ethical Clearence*

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

4.6.2. Persiapan Sebelum Perlakuan

- a. Adaptasikan 24 ekor tikus wistar dengan lingkungan selama 1 minggu
- b. Dilakukan pengambilan sampel secara acak pada ke 24 tikus wistar yang masuk kriteria inklusi
- c. Dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sehat, kontrol negative, kontrol positif, dan perlakuan
- d. Letakkan tikus di kandang kawat yang dilengkapi dengan makanan dan minuman secukupnya. Setiap kandang berisi 6 tikus. Suhu ruangan dipertahankan pada suhu 28-32°C
- e. Lakukan pencukuran punggung tikus sebesar 2x3 cm untuk area penyinaran UVB

4.6.3. Pembuatan Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka

4.6.3.1. Persiapan Simplisia

1. Kulit batang pohon nangka diambil kulit batang pohon nangka sebanyak 3 kg diambil bagian tengah pohon (1,5-2 meter dari tanah) dengan kedalaman 2 cm.

2. Dibersihkan dari kotoran dan jamur. Kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan.
3. Setelah itu ditumbuk hingga halus menjadi serbuk, didapatkan 400 gram serbuk kulit batang pohon nangka.
4. Kulit batang pohon nangka diekstrak dengan etanol 96% dan didapatkan hasil ekstraksi sebanyak 26 gram ekstrak kulit batang pohon Nangka.

4.6.3.2. Pembuatan Ekstraksi

1. Serbuk kulit pohon nangka ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian diekstraksi dengan menggunakan etanol 96% (1:10) dan dimaserasi dengan *magnetic stirer* sampai ampas sampel tidak berwarna.
2. Setelah 24 jam, rendemen disaring dengan menggunakan corong gelas yang dilapisi kertas saring, sehingga diperoleh filtrat dan residu.
3. Residu dipisahkan dan filtrat diuapkan dengan *evaporator* suhu 40°C sampai diperoleh sampel pekat (ekstrak etanol).
4. Rendemen dihitung berdasarkan berat ekstrak dibandingkan dengan berat sampel yang diekstrak dikalikan 100%

5. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\frac{\text{Berat ekstrak kental yang diperoleh}}{\text{Berat serbuk simplisia mula-mula}}$$

6. Rendeman = x 100%
7. Berat serbuk simplisia mula-mula
8. Formula untuk pembuatan krim adalah bahan untuk standar pembuatan sediaan krim seperti di bawah ini :

R/ Asam stearat	15 g
Setil alkohol	4 g
Trietanolamin	1 g
Gliserin	8 g
Metil paraben	0,1 g
Propil paraben	0,05 g
Aquades	Ad 100 g
Ekst. kulit batang nangka	x %

Keterangan : x % : Konsentrasi ekstrak kulit batang nangka

Tabel 4.1. Formula Pembuatan Krim Ekstra Kulit Batang Nangka

No	Komposisi	Jumlah (500 g)
1	Asam stearat	75
2	Setil alkohol	20
3	Trietanolamin	5
4	Gliserin	40
5	Metil paraben	0,5
6	Propil paraben	0,25
7	Aquades ad	500

Cara pembuatan basis krim:

1. Meleburkan fase minyak yaitu asam stearate, setil alcohol, dan propil paraben diatas penangas air.
2. Kemudian fase air yaitu trietanolamin, gliserin, metil paraben dan aquades dipanaskan diatas penangas air.
3. Dimasukkan fase minyak ke dalam mortir panas lalu ditambahkan fase air dan digerus hingga terbentuk basis krim.

4.6.4. Terminasi Tikus

Untuk mengambil sampel kulit pada tikus dilakukan biopsi. Sebelum dibiopsi, tikus di euthanasia dengan xylazine 20 mg/kgBB IM dan ketamin 60 mg/KgBB IM. Setelah tikus benar-benar mati, pengambilan sampel biopsy dapat dilakukan.

4.6.5. Sediaan Biopsi Kulit

1. Setelah tikus benar-benar mati, tandai daerah lesi kulit aktif dengan marker. Bersihkan daerah lesi dan kulit sekitar dengan larutan antiseptik, kemudian tutup dengan duk steril. Lakukan eksisi elips diameter 5 mm dan kedalaman hingga subkutan dan masukkan ke dalam larutan fiksasi buffer 10% selama 24 jam kemudian trimming jaringan yang akan diambil. Untuk pemeriksaan Kadar TNF α dan Kadar TGF β , jaringan kulit disimpan diatas es. Untuk pemeriksaan jumlah neutrofil dan fibroblas, rendam jaringan tersebut dengan alcohol bertingkat

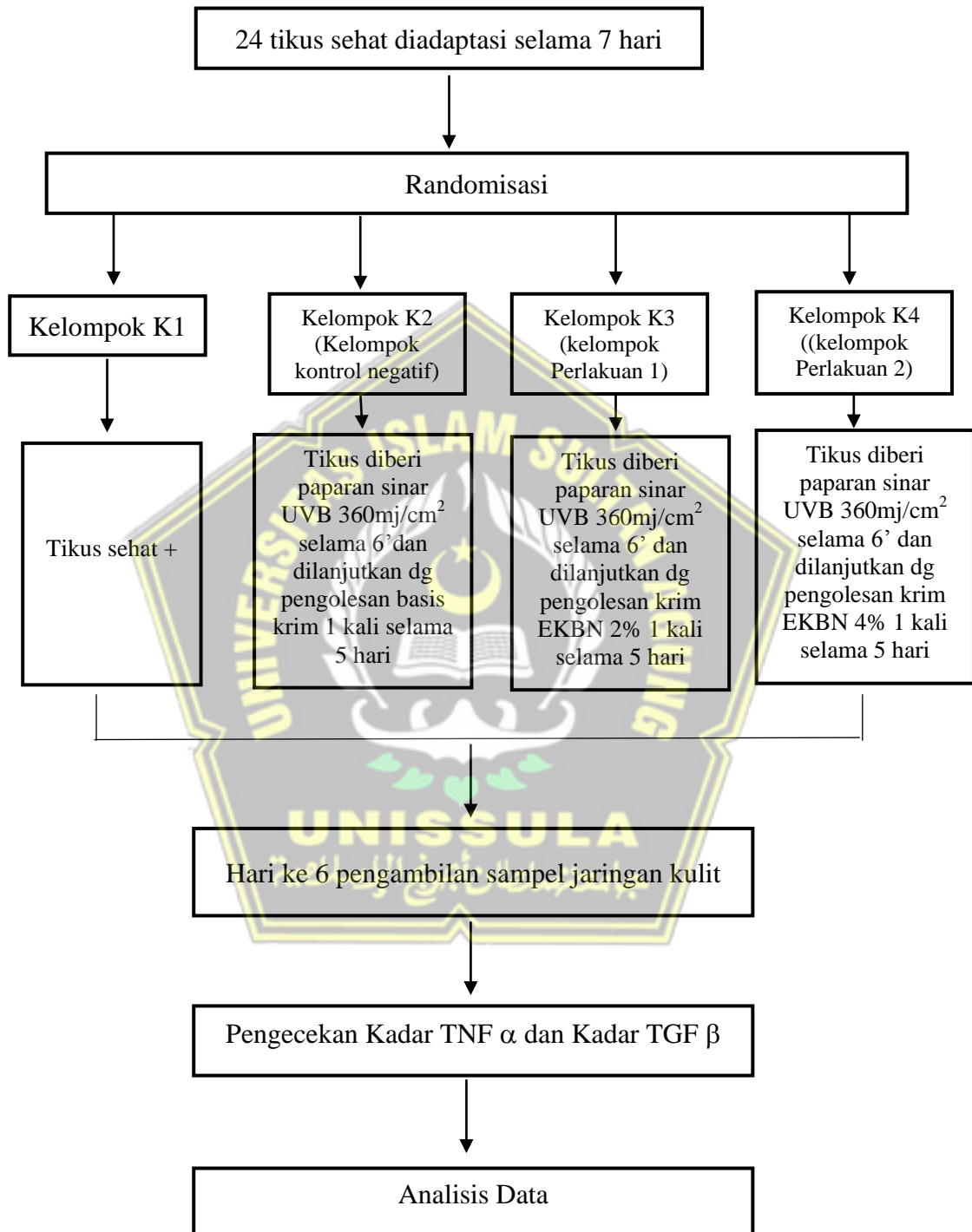
secara berurutan rendam di kadar 50%, 70%, 90% dan 100% masing-masing 2 kali selama 2 jam. Kemudian masukkan ke clearing agent (xylene) selama 24 jam sampai transparan. Lakukan infiltrasi sebanyak 2 kali masing-masing 1 jam dengan paraffin murni (histoplast) cair kemudian jaringan ditanam dalam paraffin cair dan biarkan membentuk blok selama 1 hari agar mudah diiris dengan mikrotom. Pemotongan dengan mikrotom ketebalan 4 μM diambil irisan ke 5, 10, dan 15 lalu tempelkan pada objek glass dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 60⁰C.

4.6.6. Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF-a dan TGF-B menggunakan IHC

1. Siapkan potongan jaringan kulit yang difiksasi menggunakan formalin dan kemudian dipecahkan menjadi potongan tipis sekitar 4-5 mikron menggunakan mikrotom.
2. Lakukan pemulihan antigen dengan memanaskan potongan jaringan dalam larutan buffer sitrat selama 30 menit pada suhu 95 C.
3. Cuci jaringan dengan PBS 1x selama 15 menit.
4. Ditetaskan prediluted blocking serum dan inkubasi selama 10 menit.
5. Inkubasikan potongan jaringan dengan antibodi primer spesifik terhadap TNF-a dan TGF-B, diinkubasi selama semalam di suhu 4⁰C.

6. Keluarkan sampel jaringan dari kulkas 4⁰C dan dicuci dengan PBS 1x sebanyak 3 x masing-masing 5 menit.
7. Teteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (biotinylated universal secondary antibody), inkubasi selama 10 menit.
8. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit.
9. Tambahkan 100 μ L streptavidin (HRP), inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
10. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit.
11. Tambah 100 μ L kromogen DAB dan diinkubasi selama 10 menit atau dihentikan setelah timbul warna coklat.
12. Cuci dengan akuades sebanyak 2 kali.
13. Selanjutnya, genangi jaringan dengan MayeHaematoxylin 100 μ L selama 5 menit, lalu cuci dengan akuades sampai bersih (sampai warna biru hilang).
14. Celupkan sampel jaringan dalam xylol.
15. Cuci dalam alkohol. Keringkan cover slip.
16. Lakukan mounting dengan mounting medium.
17. Tutup cover slip dengan cover slip kotak. Amati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya.
18. Positif mengekspresikan TNF-a dan TGF-B ditandai dengan warna kecoklatan pada sel.

4.7. Alur Penelitian

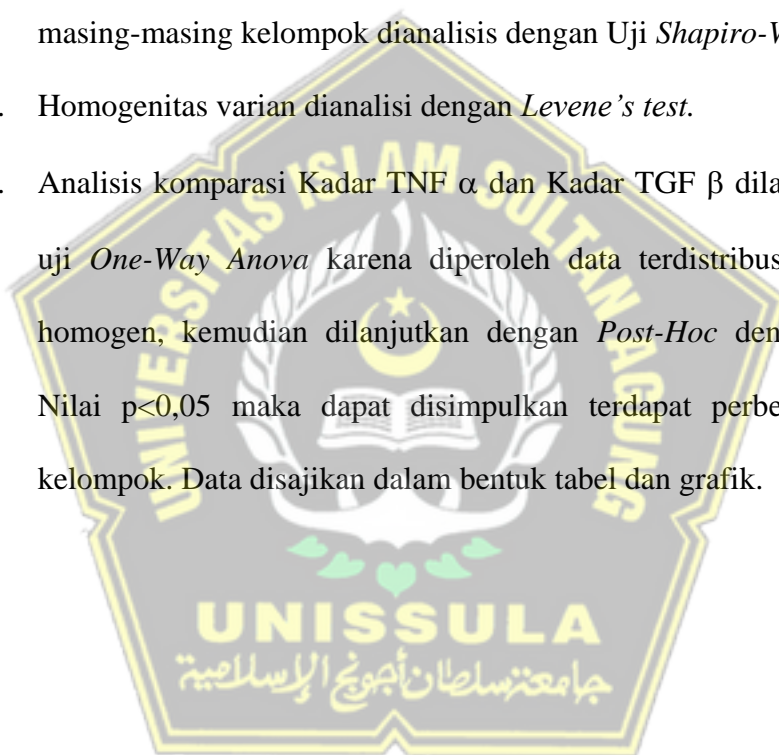


Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.8. Analisis Data

Dalam melakukan analisis data Kadar TNF α dan Kadar TGF β pada kulit tikus putih jantan galur wistar antar kelompok dilakukan langkah-langkah statistic sebagai berikut:

1. Menggunakan program SPSS.
2. Penentuan normalitas data Kadar TNF α dan Kadar TGF β pada masing-masing kelompok dianalisis dengan Uji *Shapiro-Wilk*.
3. Homogenitas varian dianalisis dengan *Levene's test*.
4. Analisis komparasi Kadar TNF α dan Kadar TGF β dilakukan dengan uji *One-Way Anova* karena diperoleh data terdistribusi normal dan homogen, kemudian dilanjutkan dengan *Post-Hoc* dengan uji LSD. Nilai $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan antar 2 kelompok. Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh krim ekstrak kulit batang nangka terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada tikus yang terpapar sinar UVB akut. Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yang dilakukan dari bulan Mei 2024 hingga Agustus 2024 di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang kemudian dilanjutkan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200 – 250 gram dan berumur 2 – 2,5 bulan yang diberi paparan UVB light 302 nm dengan intensitas energi 360 mJ/cm² selama 6 menit dan dilanjutkan dengan pemberian krim ekstrak kulit batang nangka, dilakukan selama 5 hari berturut-turut. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar yang merupakan salah satu hewan coba yang paling sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena memiliki struktur kulit mirip kulit manusia. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 24 ekor tikus jantan galur wistar dan tidak ada *drop out* selama penelitian selama berlangsung. Penelitian terdiri dari 4 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok sehat, 1 kelompok tikus kontrol negatif, 2 kelompok perlakuan. Kelompok tikus sehat merupakan tikus sehat tanpa perlakuan dan tanpa intervensi. Kelompok kontrol negatif mendapatkan krim basis tanpa ekstrak kulit batang nangka. Kelompok perlakuan pertama (K1) mendapatkan krim ekstrak kulit batang nangka dosis 2% (10mg) dan kelompok perlakuan kedua (K2) mendapatkan krim ekstrak kulit batang nangka dosis 4% (10mg) selama 5 hari berturut-turut. Pemberian krim ekstrak

kulit batang nangka dilakukan secara topikal di area kulit yang dipapar UVB secara merata.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Ekstraksi Kulit Batang Nangka dan Uji Kualitatif Skrining

Fitokimia

Ekstrak kulit batang nangka pada penelitian ini diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 7,10%. Ekstrak memiliki morfologi kental, berbau batang, dan berwarna coklat. Pada penelitian ini selanjutnya ekstrak kental kulit batang nangka dilakukan analisis skrining fitokimia secara kualitatif. Hasil skrining fitokimia dengan metode reagen spesifik diperoleh hasil bahwa ekstrak kulit batang nangka positif mengandung golongan senyawa flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna kuning dengan reaksi HCl dan Mg. Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan total flavonoid dan total fenol dalam ekstrak kulit batang nangka dengan menggunakan metode spektrofotometri. Dalam 1000 ppm ekstrak kulit batang nangka mengandung flavonoid sebesar 62,60mg/mL. Jumlah total fenol dalam 500 ppm ekstrak kulit batang nangka adalah 69,10mg/mL. Hasil ini membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung didalam ekstrak kulit batang nangka adalah golongan flavonoid.

Tabel 5.1. Uji skrining fitokimia ekstrak kulit batang nangka

Parameter Uji	Hasil Uji (Kualitatif)	Metode
Alkaloid	Negatif	Wagner
Saponin	Negatif	Forth
Tanin	Negatif	FeCl ₃ 1%
Flavonoid	Positif	Wilstater

5.1.2. Efek Pemberian Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka Terhadap Ekspresi TGF- β Pada Tikus Galur Wistar Yang Dipapar UVB Akut

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi protein TGF- β dengan metode IHC pada hari ke-6 yaitu 1 hari setelah pemberian krim ekstrak batang nangka yang terakhir. Ekspresi TGF- β dianalisis pada ke 6 hewan model tikus pada setiap kelompok dan dilakukan analisis statistika uji normalitas *saphiro wilk* dan uji homogenitas *levene test* (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Data hasil Penelitian Ekspresi TGF- β dan TNF- α

Variabel	Kelompok				pvalue
	Kontrol sehat=6 Mean \pm SD	Kontrol negatif n=6 Mean \pm SD	Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka 2% n=6 Mean \pm SD	Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka 4% n=6 Mean \pm SD	
Ekspresi TGF- β	12,84 \pm 0,98	22,41 \pm 2,29	17,18 \pm 1,54	15,95 \pm 1,67	
<i>Saphiro wilk</i>	0,417*	0,568*	0,795*	0,905*	
<i>Levene test</i>				0,272**	
<i>One way ANOVA</i>				0,006***	
Ekspresi TNF- α	1,08 \pm 0,17	2,73 \pm 0,52	1,14 \pm 0,26	0,62 \pm 0,07	
<i>Shapiro wilk</i>	0,800*	0,576*	0,433*	0,927*	
<i>Levene test</i>				0,003	
<i>One way ANOVA</i>				0,001***	

Keterangan :

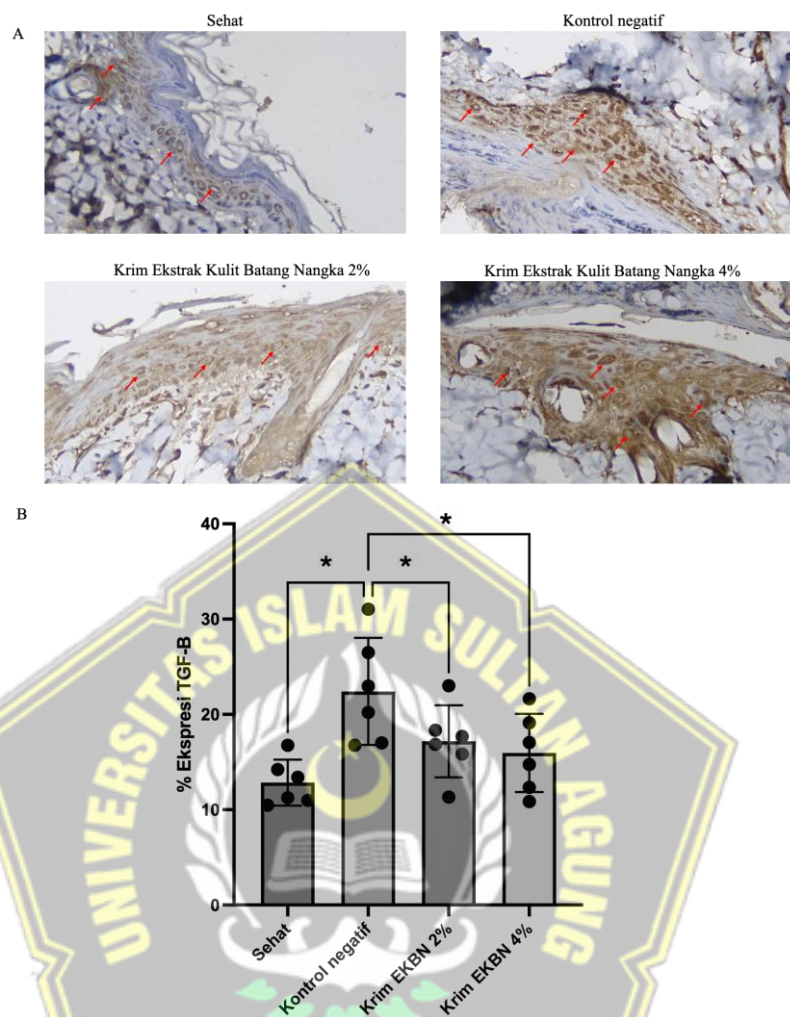
*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

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

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

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.2. Rerata ekspresi TGF- β di kelompok sehat yang terendah ($12,84 \pm 0,98$), kemudian diikuti oleh rerata ekspresi TGF- β di kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 4% ($15,95 \pm 1,67$). Selanjutnya ekspresi TGF- β pada kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 2% lebih tinggi dari kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 4% yaitu $17,18 \pm 1,54$. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif menunjukkan hasil yang unik karena memiliki ekspresi TGF- β paling tinggi di bandingkan kelompok yang lainnya, yaitu $22,41 \pm 2,29$. Data rerata ekspresi TGF- β pada seluruh kelompok penelitian terdistribusi normal karena memiliki nilai $p > 0,05$ berdasarkan hasil uji *Shapiro Wilk*. Data penelitian ekspresi TGF- β memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,272 (p > 0,05)$.

Distribusi dan varian data ekspresi TGF- β adalah normal dan homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,006 (p < 0,05)$ sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi TGF- β yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.2). Berdasarkan hasil uji IHC ekspresi TGF- β menunjukkan bahwa pemberian krim ekstrak kulit batang nangka menurunkan ekspresi TGF- β pada dosis 2% dan 4% pada tikus Wistar yang diinduksi UVB.



Gambar 5.1. (A) Gambaran immunohistokimia ekspresi TGF- β pada sampel kulit tikus dan (B) Grafik ekspresi TGF- β pada Seluruh Kelompok Penelitian. * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.

Tabel 5.3. Uji *post hoc* LSD ekspresi TGF- β pada masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,001*
	Krim ekstrak kulit batang nangka 2%	0,085
	Krim ekstrak kulit batang nangka 4%	0,207
Kontrol negatif	Krim ekstrak kulit batang nangka 2%	0,040*
	Krim ekstrak kulit batang nangka 4%	0,014*
Krim ekstrak kulit batang nangka 2%	Krim ekstrak kulit batang nangka 4%	0,615

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

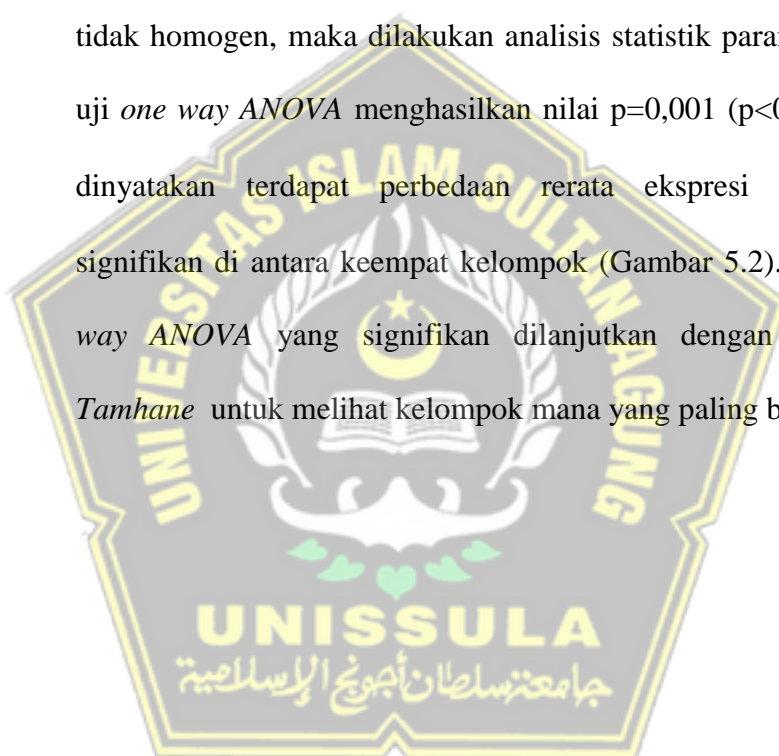
Berdasarkan data di atas didapatkan perbandingan rerata kontrol normal dengan kontrol negatif memiliki nilai signifikan $p=0,001$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak kulit batang nangka 2% memiliki nilai signifikan $p=0,040$ ($p<0,05$) dan perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak kulit batang nangka 4% memiliki nilai signifikan $p=0,014$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak kulit batang Nangka 2% terhadap krim ekstrak kulit batang Nangka 4% memiliki nilai $p=0,615$ ($p>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil uji *post hoc LSD* menunjukkan bahwa pemberian krim ekstrak kulit batang nangka dapat menurunkan ekspresi TGF- β secara signifikan pada dosis 2% dan 4% pada tikus Wistar yang diinduksi UVB.

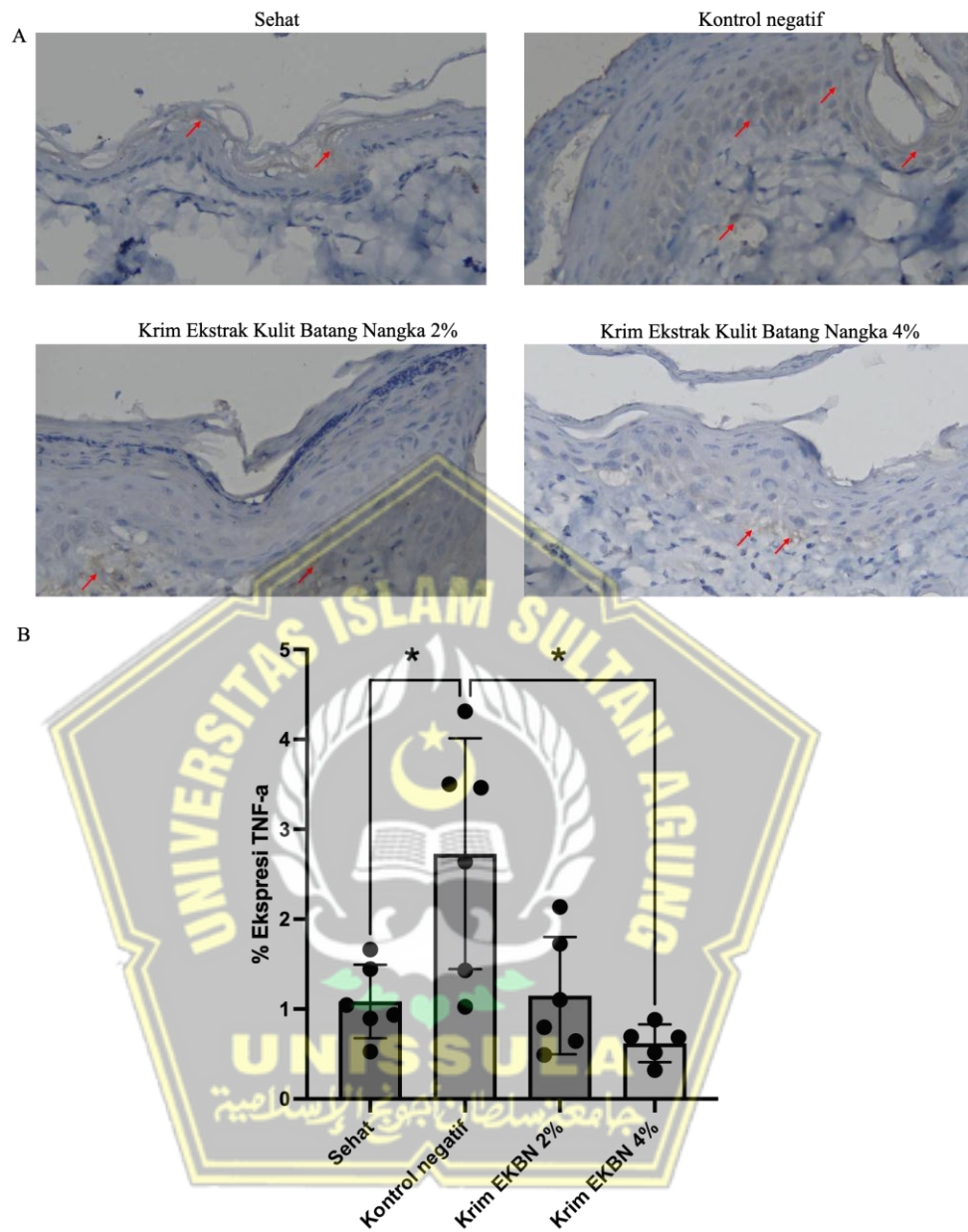
5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Kulit Batang Nangka Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Galur Wistar Yang Dipapar UVB Akut

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.2. Rerata ekspresi TNF- α di kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 4% yang terendah ($0,62\pm 0,07$), kemudian diikuti kelompok sehat $1,08\pm 0,17$, dan kelompok krim ekstrak kulit batang nangka 2% $1,14\pm 0,26$. Kelompok kontrol negatif memiliki persentase ekspresi TNF- α tertinggi yaitu sebesar $2,73\pm 0,52$. Seluruh kelompok

penelitian berdasarkan uji normalitas *Shapiro-wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ yang menunjukkan bahwa seluruh kelompok penelitian terdistribusi normal. Data penelitian ekspresi TNF- α memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,003 (p < 0,05)$.

Distribusi dan varian data ekspresi TNF- α adalah normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,001 (p < 0,05)$ sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi TNF- α yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.2). Hasil uji *one way ANOVA* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *post-hoc Tamhane* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.





Gambar 5.2. (A) Gambaran immunohistokimia ekspresi TNF- α pada sampel kulit tikus dan (B) Grafik ekspresi TNF- α pada Seluruh Kelompok Penelitian. * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.

Tabel 5.4. Uji *post hoc Tamhane* ekspresi TNF- α pada masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,038*
	Krim ekstrak kulit batang angka 2%	1,000
	Krim ekstrak kulit batang angka 4%	0,207
Kontrol negatif	Krim ekstrak kulit batang angka 2%	0,165
	Krim ekstrak kulit batang angka 4%	0,046*
Krim ekstrak kulit batang angka 2%	Krim ekstrak kulit batang angka 4%	0,484

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data di atas didapatkan perbandingan rerata kontrol normal dengan kontrol negatif memiliki nilai signifikan $p=0,038$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak kulit batang angka 2% memiliki nilai signifikan $p=0,165$ ($p>0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak kulit batang angka 4% memiliki nilai signifikan $p=0,046$ ($p>0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak kulit batang Angka 2% terhadap krim ekstrak kulit batang Angka 4% memiliki nilai $p=0,484$ ($p>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan hasil uji analisis ekspresi TNF- α menunjukkan bahwa pemberian krim ekstrak kulit batang angka dapat menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi TNF- α secara efektif dan signifikan pada dosis 4% pada tikus Wistar yang diinduksi UVB.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan UV-B akut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif DNA akibat peningkatan radikal bebas (ROS) yang ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi dan penurunan kadar *growth factor*. Stres oksidatif memulai kaskade jalur pensinyalan, yang mengarah pada induksi protein aktivator 1 (AP-1) dan *down-regulation* TGF- β , disisi lain ROS menginduksi jalur NF-kB sehingga akan mengaktifasi transkripsi sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1, dan IL-6.⁶⁸ Peningkatan ROS juga berdampak pada produksi berbagai sitokin proinflamasi TNF- α sehingga berdampak pada apoptosis sel.⁹³ Kondisi proinflamasi yang berkelanjutan berdampak pada inhibisi produksi *growth factor* prokolagen seperti TGF- β yang akan menghambat sintesis kolagen.⁶⁹ Penekanan stress oksidatif akibat paparan sinar UVB akut dapat dihambat dengan berbagai senyawa yang dapat menyeimbangkan O₂ radikal seperti senyawa flavonoid.⁷⁰ Senyawa flavonoid yang terbukti terkandung pada ekstrak batang nangka yaitu dalam kadar 62,60mg/mL pada setiap 1000ppm menunjukkan memiliki aktivitas menekan ekspresi protein TNF- α dan menekan ekspresi TGF- β pada tikus yang induksi sinar UVB akut. Pada penelitian ini hasil skrining fitokimia ekstrak kulit batang nangka yang diekstraksi dengan pelarut etanol terbukti memiliki kandungan flavonoid dan negatif mengandung alkaloid, tannin, dan saponin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak kulit batang nangka yang diekstraksi dengan pelarut polar seperti etanol cenderung lebih banyak mengandung senyawa flavonoid.⁷¹ Kandungan fitokimia suatu

tanaman juga dipengaruhi oleh lingkungan nutrisi tempat tinggal.^{71,72} Hal tersebut yang menyebabkan pada hasil skrining fitokimia ekstrak kulit batang nangka pada penelitian ini hanya positif mengandung flavonoid. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang nangka yang diolah dengan pelarut polar seperti etanol cenderung memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi.⁷¹ Total kandungan flavonoid pada ekstrak ini adalah 62,60 mg/mL yang termasuk relatif rendah. Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak etanol jelatang mengandung flavonoid kadar tinggi sebesar 133,916 mg/gram.⁷³ Penelitian ekstrak katekin menunjukkan kandungan flavonoid sebesar 342 mg/g sampel, yang juga dikategorikan tinggi.⁷⁴

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar yang dilakukan paparan sinar UVB dengan panjang gelombang UVB 302 nm dan energi 360mJ/cm² selama 5 hari. Penelitian ini didapatkan hasil bahwa krim ekstrak kulit batang nangka 2% dan 4% secara signifikan menekan ekspresi protein TNF- α dan meningkatkan ekspresi protein TGF- β pada tikus model UVB akut. Dengan pemberian krim ekstrak kulit batang nangka 2% dan 4% dapat menekan ekspresi TNF- α sebesar 1,14% dan 0,62% pada kulit tikus yang induksi sinar UVB akut. Penurunan ekspresi TNF- α ini linier dengan fenomena pada ekspresi TGF- β , dimana pemberian krim ekstrak kulit batang nangka meningkatkan ekspresi TGF- β . Kemampuan krim ekstrak kulit batang nangka dalam menurunkan ekspresi TNF- α ini menunjukkan kemampuannya sebagai antiinflamasi dan antioksidan, dimana hasil

penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya terhadap sel kulit tikus, pada pemberian krim ekstrak kulit batang nangka 1,5% dan 2% dapat menekan ekspresi enzim tyrosinase karena kemampuan antinflammasi menekan NF-kB. Kemampuan antioksidan dibuktikan dengan pengujian *2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate* yaitu ekstrak kulit batang nangka memiliki nilai kapasitas antioksidan sebesar 300ppm.⁷ Kadar molekul TNF- α yang tinggi mengakibatkan overekspresi MMP melalui aktivasi faktor transkripsi protein-1 (AP-1). Overekspresi NF-kB akan berdampak pada ketidakseimbangan regulasi siklus sel pada fase G0/G1 dan juga berdampak pada pelepasan sitokin proinflammasi.⁷⁵ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol yang mengandung flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dan mampu berperan dalam menghambat aktivasi dan ekspresi ROS melalui pembentukan oksidan stabil.⁷⁶ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa flavonoid mempunyai mekanisme langsung dalam menginaktivasi ROS melalui transfer elektron sehingga membentuk ikatan kovalen yang stabil.² Sisi lain, berbagai penelitian juga melaporkan bahwa aflavonoid berperan dalam mengkatalisis enzim SOD yang berdampak pada hambatan ekspresi ROS.⁷⁷

Pada penelitian ini krim ekstrak kulit batang nangka meningkatkan ekspresi TGF- β jika di bandingkan dengan kelompok sehat, hal ini menunjukkan bahwa krim ekstrak kulit batang nangka dapat menginduksi ekspresi TGF- β sebagai salah satu respon mencegah efek paparan sinar UVB. Namun pada kelompok kontrol negatif yang hanya di berikan basis

krim, terjadi peningkatan ekspresi TGF- β yang lebih tinggi, hal ini mungkin disebabkan oleh pada hari terminasi yaitu hari ke-6, TGF- β meningkat karena masih terlibat dalam respon inflammasi. Peningkatan TGF- β 1 setelah paparan UVB dapat dikaitkan dengan fungsinya dalam memodulasi peradangan.⁷⁸ Peningkatan ekspresi TGF- β akibat pemberian ekstrak kulit batang nangka dapat terjadi dimungkinkan karena flavonoid memiliki kemampuan antioksidan yang kuat, dapat mengikat radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa flavonoid mencegah aktivasi sel Kupffer dan stimulasi TGF- β yang biasanya dipicu oleh radikal bebas. Flavonoid dapat menghambat transformasi sel menjadi miofibroblas, yang merupakan sel penghasil TGF- β utama.⁷⁹⁻⁸² Pengaturan ini dipengaruhi oleh dosis, dimana pada dosis rendah 2% krim ekstrak kulit batang nangka mengurangi TGF- β namun tidak secara kuat menekan TNF- α , hal ini disebabkan mungkin pada dosis rendah krim ekstrak kulit buah nangka yang mengandung flavonoid menginduksi penekanan jalur pensinyalan MAPK termasuk ERK, JNK dan p38, yang secara negatif mengaktifkan jalur nuklir-faktor kappa-B (NF κ B).⁷⁹⁻⁸² Jalur NF- κ B yang diblokir dapat menghambat aktivasi sitokin antiinflamasi dan *growth factor* termasuk TGF- β .⁸³ Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa flavonoid meningkatkan jalur Nrf2, yang meningkatkan produksi enzim antioksidan seperti *glutathione S-transferase* (GST) dan NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) sehingga menekan MDA.⁸⁴

Pada penelitian ini ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol negatif meningkat secara signifikan dan memiliki hasil tidak sesuai hipotesis bahwa sinar UVB menekan ekspresi TGF- β . Hal ini dapat disebabkan oleh variasi genetik atau respon tiap hewan model.

Secara keseluruhan penelitian ini sudah berhasil membuktikan bahwa krim ekstrak kulit batang nangka memiliki fungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang dapat melindungi kulit akibat radikal bebas dari UVB akut. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pengembangan penggunaan krim ekstrak kulit batang nangka dengan menganalisis mekanisme antiinflamasi pada jalur utama pengatur inflamasi yaitu NF- κ B dan pengaruh ekstrak kulit batang nangka sebagai antioksidan dengan menganalisis kadar stress oksidatif pada kulit untuk mengetahui mekanisme aksi dengan jelas. Pengembangan penelitian melalui uji iritasi, potensi alergi, dan uji keamanan perlu dilakukan untuk mengetahui efektifitas sebagai fotoproteksi dari sinar UVB akut pada manusia.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka dapat disimpulkan :

1. Terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka dosis 2% dan 4% secara topikal terhadap ekspresi TGF- β pada kulit tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB akut.
2. Terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak kulit batang nangka dosis 2% dan 4% secara topikal terhadap ekspresi TNF- α pada kulit tikus jantan galur wistar yang dipapar UVB akut.

6.2. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan analisis mekanisme aksi krim ekstrak kulit batang nangka terhadap kadar ROS.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menganalisis mekanisme utama ekstrak kulit batang nangka sebagai fotoprotetktif terhadap sinar UVB akut, seperti menganalisis jalur yang berperan pada produksi sitokin pro inflamasi seperti NF-kB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association*. 2008;20(3).
2. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(Figure 1).
3. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
4. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994–1001.
5. Holdbrooks AT, Britain CM, Bellis SL. ST6Gal-I sialyltransferase promotes tumor necrosis factor (TNF)-mediated cancer cell survival via sialylation of the TNF receptor 1 (TNFR1) death receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(5):1610–22.
6. Ke Y, Wang XJ. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. Vol. 141, *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier B.V.; 2021. p. 1104–10.
7. Lee CW, Ko HH, Chai CY, Chen WT, Lin CC, Yen FL. Effect of *Artocarpus communis* extract on UVB irradiation-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *Int J Mol Sci*. 2013 Feb;14(2):3860–73.
8. C T Pratama GM, Gusti B R M Hartawan IN, Gusti T Indriani IA, Yusrika MU, A Suryantari SA, S Satyarsa AB, et al. Potensi Ekstrak *Spirulina platensis* sebagai Tabir Surya terhadap Paparan Ultraviolet B Potency of *Spirulina platensis* Extract as Sunscreen on Ultraviolet B Exposure. Vol. 2, *Journal of Medicine and Health Potensi Ekstrak Spirulina platensis*. 2020.
9. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions in Aging*. 2006.
10. Supriyanti FMT, Dwiyantri G, Susilo NA. *Artocarpus heterophyllus* Lamk dan aplikasinya . 2013;614–25.

11. Khan AU, Ema IJ, Faruk MR, Tarapder SA, Khan AU, Noreen S, et al. A Review on Importance of *Artocarpus heterophyllus* L. (Jackfruit). Vol. 1, *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*. Pandawa Institute; 2021. p. 106–16.
12. Wilson SE. TGF beta -1, -2 and -3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs. Vol. 207, *Experimental Eye Research*. Academic Press; 2021.
13. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. Vol. 13, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 1741–50.
14. Li S, Gu X, Yi S. The regulatory effects of transforming growth factor- β on nerve regeneration. Vol. 26, *Cell Transplantation*. Cognizant Communication Corporation; 2017. p. 381–94.
15. Gallo-Oller G, Di Scala M, Aranda F, Dotor J. Transforming growth factor beta (TGF- β) activity in immuno-oncology studies. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc.; 2020. p. 129–72.
16. Chen J, Ding ZY, Li S, Liu S, Xiao C, Li Z, et al. Targeting transforming growth factor- β signaling for enhanced cancer chemotherapy. Vol. 11, *Theranostics*. Ivyspring International Publisher; 2021. p. 1345–63.
17. Sheen YY, Kim MJ, Park SA, Park SY, Nam JS. Targeting the transforming growth factor- β signaling in cancer therapy. Vol. 21, *Biomolecules and Therapeutics*. 2013. p. 323–31.
18. Lu C, Yang Z, Yu D, Lin J, Cai W. RUNX1 regulates TGF- β induced migration and EMT in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2020 Nov 1;216(11).
19. Huai G, Markmann JF, Deng S, Rickert CG. TGF- β -secreting regulatory B cells: unsung players in immune regulation. Vol. 10, *Clinical and Translational Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2021.
20. Sorensen DW, van Berlo JH. The Role of TGF- β Signaling in Cardiomyocyte Proliferation. Vol. 17, *Current Heart Failure Reports*. Springer; 2020. p. 225–33.
21. Hao Y, Baker D, Dijke P Ten. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.

22. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF- β and BMP pathways: Implications for cancer progression. Vol. 41, *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2019. p. 702–10.
23. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
24. Zhang Q, Xiao M, Gu S, Xu Y, Liu T, Li H, et al. ALK phosphorylates SMAD4 on tyrosine to disable TGF- β tumour suppressor functions. *Nat Cell Biol*. 2019 Feb 1;21(2):179–89.
25. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Vol. 1843, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2014. p. 2563–82.
26. Supit IA, Pangemanan DHC, Marunduh SR. Profil tumor necrosis factor (tnf- α) berdasarkan indeks massa tubuh (imt) pada mahasiswa fakultas kedokteran unsrat angkatan 2014. Vol. 3, *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. Mei-Agustus; 2015.
27. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Oncotarget 7204 www.impactjournals.com/oncotarget Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs [Internet]. Vol. 9, *Oncotarget*. 2018. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
28. Parwata IMO. *Antioksidan*. 2015;
29. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Vol. 20, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014. p. 1126–67.
30. Zhang X, Feng C, Wang S, Wang Y, Fu Z, Zhang Y, et al. A novel amphibian-derived peptide alleviated ultraviolet B-induced photodamage in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021 Apr 1;136.
31. Reilly DM, Lozano J. Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. Vol. 8, *Plastic and Aesthetic Research*. OAE Publishing Inc.; 2021.
32. Wang S, Yang M, Yin S, Zhang Y, Zhang Y, Sun H, et al. A new peptide originated from amphibian skin alleviates the ultraviolet B-induced skin photodamage. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022 Jun 1;150.

33. Chiang HM, Chen CW, Lin TY, Kuo YH. N-phenethyl caffeamide and photodamage: Protecting skin by inhibiting type I procollagen degradation and stimulating collagen synthesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;72:154–61.
34. Chiang HM, Chen CW, Lin TY, Kuo YH. N-phenethyl caffeamide and photodamage: Protecting skin by inhibiting type I procollagen degradation and stimulating collagen synthesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;72:154–61.
35. Xiao Z, Yang S, Chen J, Li C, Zhou C, Hong P, et al. Trehalose against UVB-induced skin photoaging by suppressing MMP expression and enhancing procollagen I synthesis in HaCaT cells. *J Funct Foods*. 2020 Nov 1;74.
36. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
37. Baswan SM, Leverett J, Pawelek J. Clinical evaluation of the lightening effect of cytidine on hyperpigmented skin. *J Cosmet Dermatol*. 2019 Feb 1;18(1):278–85.
38. Sachs D. Article in *Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association*. 2008. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/51423323>
39. Ketut N, Putri M, Wayan I, Gunawan G, Suarsa W. Aktivitas antioksidan antosianin dalam ekstrak etanol kulit buah naga super merah (*hylocereus costaricensis*) dan analisis kadar totalnya. 2015;
40. Anggriana A. Characteristic of Jack Fruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) Fast Food which Marketed in Palu City. Vol. 5, e-J. *Agrotekbis*. 2017.
41. Silalahi. Pemanfaatan nangka (*artocarpus heterophyllus*) sebagai obat tradisional dan bioktivitiesnya. Vol. 11, *Husada Mahakam : Jurnal Kesehatan*. 2021.
42. Studi P, Farmasi S, Tinggi S, Kesehatan I, Medan S, Simanjuntak HA, et al. Kajian Potensi Tumbuhan Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) dalam Pengobatan Penyakit Infeksi. Vol. 5. 2022.
43. Peter Jorgensen SRI. Extracellular Matrix Modulates Morphology, Growth, Oxidative Stress Response and Functionality of Human Skin Fibroblasts during Aging In Vitro. *J Aging Sci*. 2014;02(02).

44. Samara A et al. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. . doi:103390/antiox3040745. 2014;745–57.
45. Badan pengawas obat dan makanan republik indonesia. 2013.
46. Hartanti L, Setiawan HK. Daya Hambat Beberapa Turunan Asam Sinamat Sintetik Terhadap Enzim Tirosinase. 2009;9:158–68.
47. Maksimal F. reactive oxygen species. 2016;176–89.
48. Chang T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. doi:103390/ijms10062440. 2009;2440–75.
49. Swami SB, Thakor NJ, Haldankar PM, Kalse SB. Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. 2012;565–76.
50. Tanjung E, Ms MH, Thalib I, Suhartono E. Evaluation of Antioxidant Activity of Some Selected Tropical Fruits in South Kalimantan , Indonesia. 2014;2010–4.
51. Ranasinghe RASN, Maduwanthi SDT, Marapana RAUJ. Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. Vol. 2019, International Journal of Food Science. Hindawi Limited; 2019.
52. Trends C. Anti-aging Effects of Select Botanicals: Scientific. . doi:103390/cosmetics5030054. 2018;1–15.
53. Draelos ZD. Cosmetic Dermatology. . 2010;
54. Kepala P et al. Badan pengawas obat dan makanan republik indonesia. . 2012;1–28.
55. Kariosentono H. Kelainan Pigmentasi Kulit dan Penuaan Dini serta Peran Pendidikan Kedokteran DIBidang Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin. . 2015;
56. P MYC. Pengaruh pemberian ekstrak kulit batang nangka (*artocarpus heterophyllus* lamk .) terhadap gambaran histopatologi cerebrum mencit yang diinfeksi *toxoplasma gondii*. . 2015;
57. Yenny SW et al. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. . 2012;423–30.
58. Addor FAS. Antioxidants in dermatology. An. Bras. Dermatol. 2017;356–62.

59. Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang S Bin, Park SJ, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via shp-2 oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(16):2528–40.
60. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6).
61. Rihhadatulaisy S, Aliza Putriana N. Aktivitas anti aging pada beberapa tanaman dengan berbagai metode pengujiannya. Vol. 18. 2019.
62. Maria Cavinato, Birgit Waltenberger, Giorgia Baraldo, Carla V. C. Grade HS& PJD. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 2017;
63. Maria Cavinato, Birgit Waltenberger, Giorgia Baraldo, Carla V. C. Grade HS& PJD. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 2017;
64. Shipp J, Abdel-Aal ESM. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. Vol. 4, *The Open Food Science Journal*. 2010.
65. Wang , LS., Stoner GD. Anthocyanins And Their Role in Cancer Prevention. Department of Internal Medicine and Comprehensive Cancer Center, Ohio State University College of Medicine, Columbus. 2008;
66. Ketut N, Putri M, Wayan I, Gunawan G, Suarsa W. Aktivitas antioksidan antosianin dalam ekstrak etanol kulit buah naga super merah (*hylocereus costaricensis*) dan analisis kadar totalnya. 2015;
67. Hussaana A, Suparmi, Murti HA. Protective effect of bixin isolated from *Bixa orellana* L. Seeds on UVB-induced inflammation and immunosuppression of the skin. Vol. 18, *Bangladesh Journal of Medical Science*. Ibn Sina Trust; 2019. p. 107–11.
68. Seol JE, Ahn SW, Seol B, Yun HR, Park N, Kim HK, et al. Echinochrome A Protects against Ultraviolet B-induced Photoaging by Lowering Collagen Degradation and Inflammatory Cell Infiltration in Hairless Mice. 2021;
69. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-13 mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. Vol. 48, *Kidney International*. 1995.

70. Brunetti C, di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. Vol. 14, International Journal of Molecular Sciences. 2013. p. 3540–55.
71. Sreeja Devi PS, Kumar NS, Sabu KK. Phytochemical profiling and antioxidant activities of different parts of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae): A review on current status of knowledge. *Futur J Pharm Sci.* 2021 Dec;7(1).
72. Ranasinghe RASN, Maduwanthi SDT, Marapana RAUJ. Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. Vol. 2019, International Journal of Food Science. Hindawi Limited; 2019.
73. Fattahi S, Zabihi E, Abedian Z, Pourbagher R, Ardekani AM, Mostafazadeh A, et al. Total Phenolic and Flavonoid Contents of Aqueous Extract of Stinging Nettle and In Vitro Antiproliferative Effect on Hela and BT-474 Cell Lines. 2014.
74. Ayele DT, Akele ML, Melese AT. Analysis of total phenolic contents, flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Croton macrostachyus* root extracts. *BMC Chem.* 2022 Dec 1;16(1).
75. Ryu JY, Na EJ. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. *Biomedical Dermatology.* 2018 Dec;2(1).
76. Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients.* 2016;8(10):8–11.
77. Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia.* 2014;23(4):239–44.
78. Lee T H suk, Kooshesh fatemeh, Sauder DN, Kondo S. Experimental Dermatology Modulation of TGF- β 1 production from human keratinocytes by UVB. 1997.
79. Seo J, Lee HS, Ryoo S, Seo JH, Min BS, Lee JH. Tangeretin, a citrus flavonoid, inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells by blocking AKT activation. *Eur J Pharmacol.* 2011 Dec 30;673(1–3):56–64.
80. Koolaji N, Koolaji N, Shammugasamy B, Shammugasamy B, Schindeler A, Schindeler A, et al. Citrus Peel Flavonoids as Potential Cancer Prevention Agents. *Curr Dev Nutr.* 2020;4(5):1–20.

81. Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph B v., Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
82. Singh R, Agarwal R. Natural Flavonoids Targeting Deregulated Cell Cycle Progression in Cancer Cells. *Curr Drug Targets*. 2006;7(3):345–54.
83. Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X, et al. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene*. 2013;32(12):1549–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.171>
84. Insanu M, Pramasatya H, Buddhisuharto AK, Tarigan C, Zahra AA, Haniffadi A, et al. Unused Parts of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*): Prospective In Vitro Antioxidative Activity. *Open Access Maced J Med Sci*. 2022 Jul 29;10(A):1529–36.

