

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM BERAS HITAM TERHADAP  
EKSPRESI GEN IL-1 $\beta$  DAN MITF  
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus C57BL/6J Model Hiperpigmentasi  
yang Terpapar UVB)**

**TESIS**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

**Santi Cintya Dewi**

**MBK.2220010331**

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

**2024**

**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BERAS HITAM TERHADAP  
EKSPRESI GEN IL-1 $\beta$  DAN MITF  
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus C57BL/6J Model Hiperpigmentasi  
yang Terpapar UVB)**

Disusun oleh :

**Santi Cintya Dewi**

**MBK.2220010331**

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes  
NIDN. 0022046101.

Pembimbing II



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E  
Subsp.D.K.E,FINS DV,FAADV  
NIK. 8951110021

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Fakultas Kedokteran Unissula



MAGISTER BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNISSULA

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

## PERNYATAAN

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



Semarang, Agustus 2024  
Yang menyatakan,



Santi Cintya Dewi

## KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN KRIM BERAS HITAM TERHADAP EKSPRESI GEN IL-1 $\beta$  DAN MITF (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus C57BL/6J Model Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)** Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

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

4. Prof Dr.Ir Hj Titiek Sumarawati,M.Kes selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Prof. Dr. dr Prasetyowati Subchan,Sp.D.V.E Subsp.D.K.E,FINSDV,FAADV selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF selaku penguji I dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
7. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji II dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
8. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku penguji III dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
5. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Agustus 2024

Penulis,

**Santi Cintya Dewi**



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> (MITF) .....	9
2.1.1. Definisi .....	9
2.1.2. Peran MITF dalam hiperpigmentasi.....	9
2.2. Interleukin-1 $\beta$ .....	12
2.2.1. Definisi Interleukin-1 $\beta$ .....	12
2.2.2. Peran Interleukin-1 $\beta$ terhadap Hiperpigmentasi.....	12
2.3. Ekstrak Beras Hitam.....	14
2.3.1. Definisi Ekstrak Beras Hitam .....	14

2.3.2. Peran Ekstrak Beras Hitam sebagai Antioksidan .....	14
2.4. <i>Hiperpigmentasi</i> .....	15
2.4.1. Definisi .....	15
2.4.2. Proses <i>Hiperpigmentasi</i> .....	15
2.5. Efek Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen IL-1 $\beta$ dan MITF.....	17
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Kerangka Teori.....	19
3.2. Kerangka Konsep .....	22
3.3. Hipotesis.....	22
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	23
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	24
4.2.1. Variabel Penelitian .....	24
4.2.2. Definisi Operasional .....	24
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian .....	25
4.3.1. Subjek Penelitian .....	25
4.3.2. Sampel Penelitian .....	26
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian .....	26
4.3.4. Besar Sampel .....	27
4.4. Alat dan Bahan .....	27
4.4.1. Alat .....	27
4.4.2. Bahan .....	28
4.5. Cara Penelitian .....	28
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i> .....	28
4.5.2. Pembuatan Ekstrak Beras Hitam .....	28
4.5.3. Pembuatan Krim Ekstrak Beras Hitam.....	28
4.5.4. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB .....	29
4.5.5. Pengecekan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin .	30
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan.....	31



4.5.7. Analisis Kuantitatif Ekspresi IL-1 $\beta$ dan MITF menggunakan RT-PCR .....	31
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
4.7. Analisa Data .....	32
4.8. Alur Penelitian.....	34
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>35</b>
5.1. Hasil Penelitian .....	36
5.1.1. Ekstraksi Beras Hitam dan Uji Kualitatif Skrining Fitokimia.....	36
5.1.2. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen IL-1 $\beta$ Pada Tikus Galur <i>C57BL/6J</i> Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB .....	38
5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi gen MITF Pada Tikus Galur <i>B6J</i> Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB.....	41
5.2. Pembahasan.....	44
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
6.1. Kesimpulan.....	48
6.2. Saran.....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>58</b>

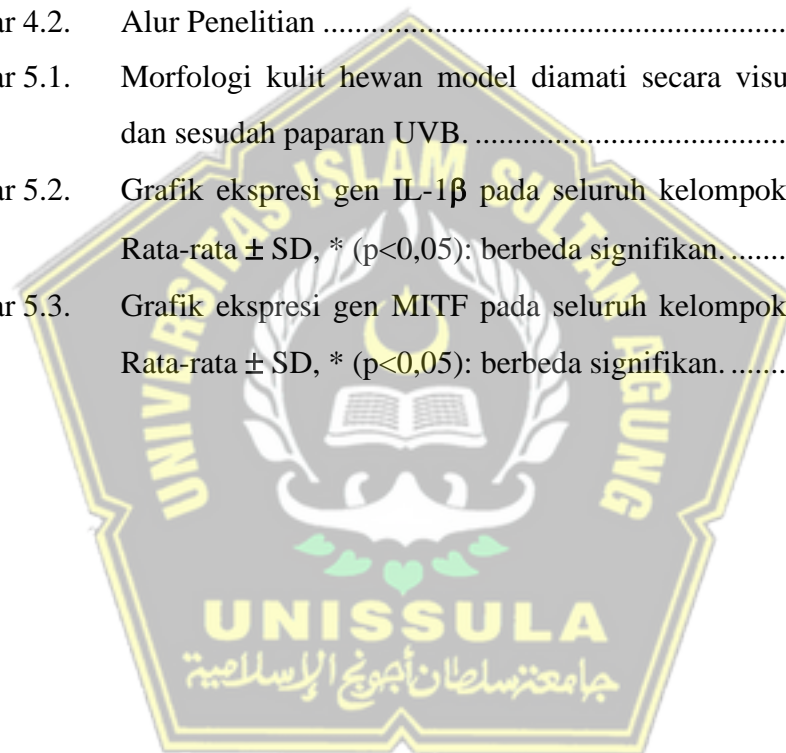
## DAFTAR SINGKATAN

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

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

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Jalur pensinyalan di mana MITF-M mengatur melanogenesis dalam melanosit .....	11
Gambar 2.2.	Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB .....	17
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	21
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep .....	22
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian .....	23
Gambar 4.2.	Alur Penelitian .....	34
Gambar 5.1.	Morfologi kulit hewan model diamati secara visual sebelum dan sesudah paparan UVB. ....	37
Gambar 5.2.	Grafik ekspresi gen IL-1 $\beta$ pada seluruh kelompok penelitian. Rata-rata $\pm$ SD, * (p<0,05): berbeda signifikan. ....	40
Gambar 5.3.	Grafik ekspresi gen MITF pada seluruh kelompok penelitian. Rata-rata $\pm$ SD, * (p<0,05): berbeda signifikan. ....	42



## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1.	Komposisi Krim Ekstrak Beras Hitam .....	29
Tabel 5.1.	Uji skrining fitokimia ekstrak beras hitam .....	36
Tabel 5.2.	Uji analisis kuantitatif kandungan ekstrak beras hitam .....	37
Tabel 5.3.	Data hasil Penelitian Ekspresi Gen IL-1 $\beta$ dan MITF .....	38
Tabel 5.4.	Uji <i>post hoc Tamhane</i> ekspresi gen IL-1 $\beta$ pada masing-masing Kelompok.....	40
Tabel 5.5.	Uji <i>Mann Whitney</i> ekspresi gen MITF pada masing-masing Kelompok.....	43



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearens</i> .....	58
Lampiran 2. Statistika .....	59
Lampiran 3. Hasil Skrining Fitokimia .....	66
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian .....	67



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Paparan sinar *ultraviolet B* (UVB) yang diemisikan oleh matahari dapat memicu timbulnya berbagai masalah kulit seperti hiperpigmentasi<sup>1</sup>. Paparan Sinar UVB secara berkepanjangan dapat menginduksi terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) pada kulit yang mengaktivasi sitokin pro-inflamasi seperti *interlukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) sehingga meningkatkan produksi melanin<sup>2</sup>. Peningkatan ROS dapat mengaktivasi beberapa gen yang terlibat dalam proses hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB, diantaranya *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) yang merupakan faktor utama untuk regulasi melanogenesis dan fungsi melanosit<sup>3,4</sup>. Tingginya peningkatan ekspresi IL-1 $\beta$  dan MITF berdampak pada peningkatan produksi melanin yang menyebabkan timbulnya hiperpigmentasi.<sup>5,6</sup> Hingga saat ini terkait dengan variasi dosis krim beras hitam masih sedikit, sehingga pada penelitian ini akan dianalisis efek pemberian ekstrak beras hitam pada dosis 7,5% dan 15% terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF.

Pada tahun 2020, 6,2% dari 182 subjek positif mengalami hiperpigmentasi setelah terpapar tiga kali UVB dengan *minimal erythema dose* (MED) 390mj/cm<sup>27,8</sup> Kasus hiperpigmentasi semakin meningkat pada tahun 2022 hingga ~110.350 kasus baru<sup>9</sup>. Keseluruhan kasus hiperpigmentasi ini, 8% diantaranya menyebabkan karsinoma skuamosa

yang dikenal dengan kanker kulit melanoma dengan potensi metastasis tinggi.<sup>10</sup> Saat ini pencegahan hiperpigmentasi dengan beberapa agen kimiawi seperti arbutin, asam azelaic, asam kojik, dan hidrokuinon dilaporkan menimbulkan efek samping yang merugikan seperti iritasi kulit, dermatitis kontak, dan kanker kulit. Penggunaan senyawa alami sangat diperlukan dalam mengatasi permasalahan hiperpigmentasi dengan minimal efek samping.<sup>11-13</sup>

Pemberian antioksidan terbukti dapat menurunkan kadar ROS sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada penekanan melanogenesis.<sup>14</sup> Beras hitam mengandung berbagai senyawa metabolit seperti flavonoid, saponin, dan triterpenoids yang terbukti memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan.<sup>15,16</sup> Penelitian terdahulu melaporkan bahwa beras hitam menghambat melanogenesis melalui fosforilasi ERK, p38, dan AKT dalam sel melanoma, dan mengurangi kandungan melanin tanpa efek sitotoksik.<sup>17</sup> Ekstrak beras hitam dosis 0,4mg/mL menghambat aktivitas tyrosinase hingga 80,50% sehingga mencegah pembentukan melanin.<sup>18,19</sup> Beras hitam, kaya akan antosianin dan flavonoid, menunjukkan sifat antioksidan dan antiinflamasi kuat yang berkontribusi terhadap efek terapeutiknya.<sup>15,20</sup> Kapasitas antioksidan ekstrak beras hitam dikaitkan dengan kemampuannya memodulasi ekspresi gen terkait jalur penuaan dan respons stres. Pemberian ekstrak beras hitam telah terbukti menurunkan regulasi ekspresi mRNA *age-1* dan *daf-2* sekaligus meningkatkan regulasi



level mRNA *daf-16* dan meningkatkan ekspresi protein antioksidan seperti SOD-3, CTL-1, dan GST-4.<sup>21</sup>

Beras hitam dapat menghambat aktivasi jalur *nuclear factor kappa beta* (NF- $\kappa$ B) sehingga menekan transkripsi sitokin proinflamasi seperti IL-6, *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ), dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ).<sup>22,23</sup> Penghambatan NF- $\kappa$ B dapat menginduksi aktivasi jalur PI3K/Akt yang akhirnya mungkin meninhibisi aktivasi MITF pada sel melanoma.<sup>24,25</sup> Disisi lain sitokin hambatan IL-1 $\beta$  dapat mencegah melanogenesis melalui penghambatan jalur MAPK sehingga menurunkan ekspresi MITF.<sup>26-28</sup> Penelitian menunjukkan ekstrak beras hitam dengan dosis 300 mg/kg/hari memiliki aktivitas antioksidan efektif dengan mencegah gangguan metabolisme, menjaga normal glukosa darah, insulin, HOMA-IR, trigliserida, dan kolesterol, serta mencegah gangguan ginjal dengan menekan peroksidasi lipid.<sup>29</sup> Mekanisme molekuler yang mendasari aktivitas ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada hiperpigmentasi kulit hingga saat ini masih belum jelas. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada tikus galur C57BL/6J yang mengalami hiperpigmentasi akibat diinduksi sinar UVB.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada tikus jantan galur C57BL/6J model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada tikus jantan galur C57BL/6J model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam pada dosis 7,5% dan 15% terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada tikus jantan galur C57BL/6J model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam pada dosis 7,5% dan 15% terhadap ekspresi gen MITF pada tikus jantan galur C57BL/6J model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

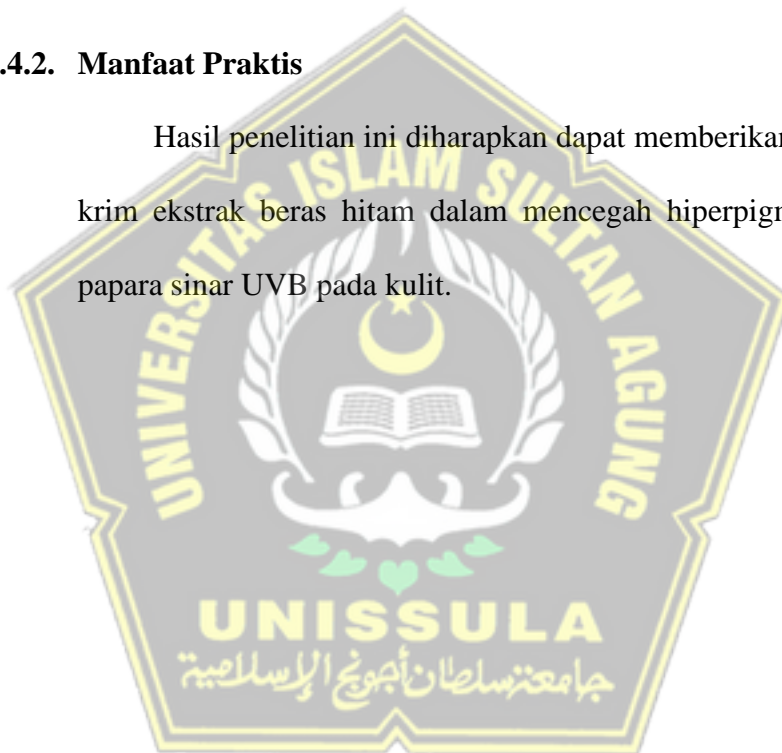
## **1.4. Manfaat penelitian**

### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada tikus jantan galur *C57BL/6J* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB

### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan krim ekstrak beras hitam dalam mencegah hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB pada kulit.



## 1.5. Originalitas Penelitian

**Tabel 1.1. Originalitas Penelitian**

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Zukhiroh, Agung Putra, Chodidjah, Titiek Sumarawati, Prosetyowati Subchan, Setyo Trisnadi, Nurul Hidayah, Nur Dina Amalina, 2021 <sup>30</sup>	<i>Effect of Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats</i>	Eksperimental, <i>Invivo</i>	Induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur C57BL/6J dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm <sup>2</sup> sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan <i>spesifik staining</i> melanin pada hari ke 14.
2	Sun-nyoung hwang, Jae-cheon kim, Mohammad Iqbal Hossain Bhuiyan, Joo youn kim, Ji seon yang, Shin hee yoon, Kee dong yoon, Seong yun kim <sup>29</sup>	<i>Black Rice (Oryza sativa L., Poaceae) Extract Reduces Hippocampal Neuronal Cell Death Induced by Transient Global Cerebral Ischemia in Mice</i>	Eksperimental, <i>Invivo</i>	Ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan dosis 300mg/kgBB/hari dengan menghambat peroksidasi lipid dan stress oksidatif pada tikus model cerebral iskemia.
3	Mahdi Jufri, Afifah Vardhani, Erni Purwaningsih <sup>18</sup>	<i>Evaluating the Efficacy of Krim Containing Black Rice Bran (Oryza sativa L. indica) Extract as Skin Brightening Agent: A Clinical Trial</i>	Eksperimental, <i>Clinical trial</i>	Krim yang mengandung 10% ekstrak beras hitam ini efektif sebagai pencerah kulit karena efektif menurunkan produksi melanin pada kulit
4	Afifah vardhani, Mahdi jufri, Erni purwaningsih <sup>31</sup>	<i>Potency Of <math>\Gamma</math>-Oryzanol-Rich Black Rice Bran (Oryza Sativa L. Indica) Extract For Tyrosinase Inhibition</i>	Eksperimental, <i>Invivo</i>	Ekstrak beras hitam mengandung 118,572 mg/g $\gamma$ -oryzanol, dan ekstraknya menghambat aktivitas tirosinase pada IC50 74,8%.
5	Mira han, Jung-soo bae, jae-jun ban, Hee soon hin, Dong hun lee, Ho chung <sup>32</sup>	<i>Black rice extract modulate ultraviolet-induced expression of matrix</i>	Eksperimental <i>Invitro</i>	Ekstrak beras hitam secara signifikan meningkatkan ekspresi prokolagen tipe I, dan menurunkan ekspresi MMP-1 dan MMP-3 pada

---

*metalloproteinases  
and procollagen in  
a skin cell model*

sel HDF yang diradiasi UVB. Mekanisme yang mendasari hasil ini melibatkan penurunan aktivitas p38 dan c-Jun N-terminal kinase, dan penekanan aktivasi aktivator protein-1 (AP-1) yang diinduksi UVB. Ekstrak beras hitam mengurangi produksi spesies oksigen reaktif yang diinduksi UVB dalam sel HaCaT dengan cara yang bergantung pada dosis.

---

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa induksi hiperpigmentasi pada tikus jantan galur C57BL/6J dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm<sup>2</sup> sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan *spesifik staining* melanin pada hari ke 14.<sup>30</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan dosis 300mg/kgBB/hari dengan menghambat peroksidasi lipid dan stress oksidatif pada tikus model cerebral iskemia.<sup>29</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa krim yang mengandung 10% ekstrak beras hitam ini efektif sebagai pencerah kulit karena efektif menurunkan produksi melanin

pada kulit.<sup>18</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa Ekstrak beras hitam mengandung 118,572 mg/g  $\gamma$ -oryzanol, dan ekstraknya menghambat aktivitas tirosinase pada IC50 74,8%.<sup>31</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana ekstrak beras hitam akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak beras hitam secara signifikan meningkatkan ekspresi prokolagen tipe I, dan menurunkan ekspresi MMP-1 dan MMP-3 pada sel HDF yang diradiasi UVB. Mekanisme yang mendasari hasil ini melibatkan penurunan aktivitas p38 dan c-Jun N-terminal kinase, dan penekanan aktivasi aktivator protein-1 (AP-1) yang diinduksi UVB. Ekstrak beras hitam mengurangi produksi spesies oksigen reaktif yang diinduksi UVB dalam sel HaCaT dengan cara yang bergantung pada dosis.<sup>32</sup> Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. *Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)***

##### **2.1.1. Definisi**

MITF dikenal sebagai protein helix-loop-helix dasar kelas E 32 atau bHLHe32 adalah protein yang pada manusia dikodekan oleh gen MITF. MITF adalah faktor transkripsi ritseting heliks-loop-helix dasar yang terlibat dalam regulasi jalur spesifik garis keturunan dari banyak jenis sel termasuk melanosit, osteoklas, dan sel mast. MITF mungkin terlibat dalam kaskade pensinyalan yang secara khusus diperlukan untuk kelangsungan hidup dan fungsi fisiologis prekursor sel normal melanosit<sup>3</sup>.

##### **2.1.2. Peran MITF dalam hiperpigmentasi**

MITF, bersama dengan faktor transkripsi EB (TFEB), TFE3 dan TFEC, termasuk dalam subfamili protein bHLHZip terkait, yang disebut keluarga faktor transkripsi MIT-TFE. Faktor-faktor tersebut mampu membentuk homo dan heterodimer pengikat DNA yang stabil. Target protumorogeniknya meliputi faktor-faktor yang terlibat dalam kematian sel, replikasi DNA, perbaikan, mitosis, produksi microRNA, perdagangan membran, dan metabolisme mitokondria<sup>33</sup>. Mutasi gen ini menyebabkan ketulian, pengeroposan tulang, mata kecil, dan mata serta kulit berpigmen buruk. Pada subjek manusia,

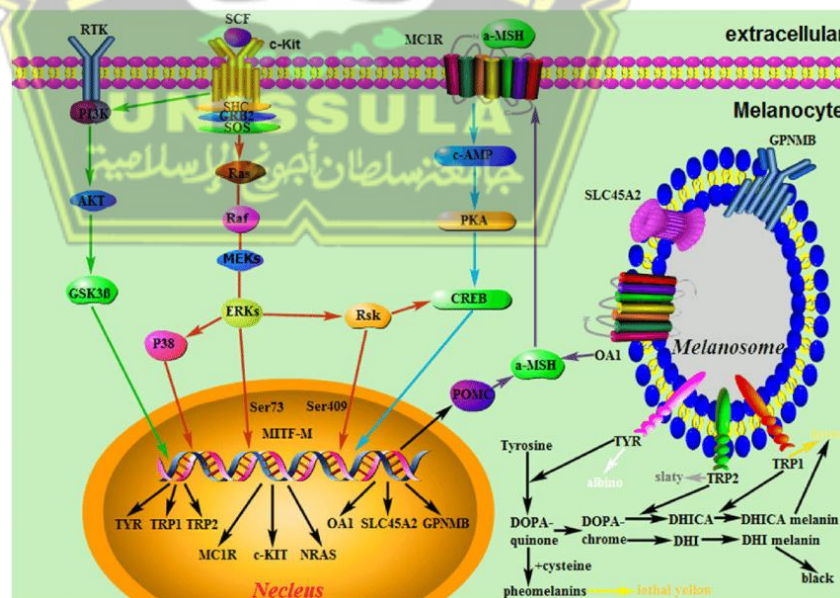
karena diketahui bahwa MITF mengontrol ekspresi berbagai gen yang penting untuk sintesis melanin normal dalam melanosit, mutasi MITF dapat menyebabkan penyakit seperti melanoma, sindrom Waardenburg, dan sindrom Tietz <sup>34</sup>.

Mekanisme biokimia hiperpigmentasi yaitu: 1) tingkat methylcobalamin yang rendah dalam melanosit menyebabkan penurunan tingkat glutathione tereduksi (GSSH); yang pada gilirannya mengaktifkan enzim tirosinase dalam jalur sintesis melanin, 2) sintesis DNA yang rusak mengaktifkan faktor transkripsi terkait Microphthalmia (MITF); yang menyebabkan aktivasi dari tirosinase dan protein terkait tirosinase 1 dan 2 (TRP 1 dan 2) <sup>35</sup>. 3) hiperhomosisteinemia menyebabkan akumulasi sistein yang menyebabkan peningkatan sintesis melanin, 4) cacat transfer melanin dari melanosit ke keratinosit megaloblastik yang berdekatan. Peningkatan angiogenesis sekunder untuk upregulasi dermal vascular endothelial growth factor (VEGF) juga dapat menyebabkan peningkatan pigmentasi. Baik studi histopatologi dan ultrastruktural telah mendalilkan bahwa hiperpigmentasi disebabkan oleh peningkatan jumlah melanosit basal serta peningkatan melanosom <sup>10</sup>.

Biosintesis melanin diprakarsai oleh beberapa rangsangan termasuk radiasi UV, sitokin inflamasi, dan sinyal hormonal. Secara khusus, *α-melanocyte stimulating hormone* ( $\alpha$ -MSH) yang



dilepaskan dari keratinosit yang terpapar sinar UV dapat merangsang biosintesis melanin di epidermal melanosit dengan mengaktifkan sumbu cAMP-PKA-CREB (*cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A-cAMP response element binding protein*)<sup>36</sup>. Sumbu cAMP-PKA-CREB yang diaktifkan menyebabkan peningkatan mRNA yang mengkode faktor transkripsi terkait *mikrophthalmia* (MITF). MITF meningkatkan ekspresi gen *tyrosinase* (TYR), *tyrosinase-related protein 1* (TYRP1), dan *tyrosinase-related protein 2* (TYRP2) pada stimulasi  $\alpha$ -MSH di melanosit<sup>37</sup>. Selain itu, banyak jalur pensinyalan yang mengontrol pertumbuhan sel, termasuk *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), *ekstraseluler response kinase* (ERK), dan AKT, sangat penting untuk melanogenesis dengan mengatur stabilitas dan aktivitas MITF.



**Gambar 2.1.** Jalur pensinyalan di mana MITF-M mengatur melanogenesis dalam melanosit<sup>36</sup>

Enzim tirosinase, tembaga multifungsi -mengandung oksidase, berperan penting dalam biosintesis melanin dengan mengkatalisis reaksi di mana L-tirosin dihidroksilasi menjadi *L-dihidroksifenilalanin* (L-DOPA) dan L-DOPA dioksidasi menjadi *o-kuinon* (dopakuinon) <sup>38</sup>. Oleh karena itu, beberapa inhibitor tirosinase juga menghambat biosintesis melanin, dan ini termasuk resveratrol, arbutin, dan hinokitiol, yang semuanya telah digunakan dalam aplikasi kosmetik pemutih kulit.

## 2.2. Interleukin-1 $\beta$

### 2.2.1. Definisi Interleukin-1 $\beta$

*Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) adalah sitokin proinflamasi dengan beragam peran biologis, termasuk keterlibatannya dalam nyeri, peradangan, kondisi autoimun, dan respons pertahanan tubuh terhadap infeksi dan cedera, juga terlibat dalam hiperpigmentasi akibat sinar UVB.<sup>39</sup> IL-1 $\beta$  diketahui memberikan efek pleiotropik pada berbagai sel dan memainkan peran penting dalam gangguan inflamasi dan autoimun akut dan kronis. IL-1 $\beta$  juga dianggap sebagai pengatur utama peradangan, mengendalikan berbagai proses kekebalan bawaan.<sup>40,41</sup>

### 2.2.2. Peran Interleukin-1 $\beta$ terhadap Hiperpigmentasi

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa radiasi UVB dapat menyebabkan sekresi IL-1 $\beta$ , yang pada gilirannya mendorong

melanogenesis dengan meningkatkan regulasi ekspresi *tirosinase* (TYR) dan *protein-1 terkait tirosinase* (TRP-1) dalam melanosit.<sup>41</sup> Proses ini melibatkan peningkatan regulasi tingkat ekspresi IL-1 $\beta$  mRNA sebagai respons terhadap radiasi UVB, yang menyebabkan peningkatan kandungan melanin dan aktivitas TYR dalam sel melanoma. IL-1 $\beta$  telah ditemukan merangsang ekspresi faktor lain seperti faktor sel induk (SCF) dan *siklooksigenase-2* (COX-2) dalam keratinosit, yang selanjutnya berkontribusi terhadap sintesis melanin dalam melanosit.<sup>42</sup>

Peran IL-1 $\beta$  dalam hiperpigmentasi yang diinduksi UVB didukung oleh pengamatan bahwa tikus yang kekurangan reseptor IL-1 atau kekurangan IL-1 $\beta$  mengembangkan kista epidermal setelah paparan UVB kronis, yang menunjukkan adanya perubahan respon imun bawaan. Temuan ini menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  memainkan peran penting dalam memediasi efek radiasi UVB pada pigmentasi kulit. Secara keseluruhan IL-1 $\beta$  tampaknya merupakan pengatur hulu hiperpigmentasi yang diinduksi UVB, mendorong melanogenesis dengan meningkatkan regulasi ekspresi enzim dan faktor utama melanogenik. Memahami keterlibatan IL-1 $\beta$  dalam proses ini dapat memberikan wawasan untuk pengembangan pendekatan anti-inflamasi untuk mengurangi hiperpigmentasi akibat UVB.<sup>42,43</sup>

## 2.3. Ekstrak Beras Hitam

### 2.3.1. Definisi Ekstrak Beras Hitam

Ekstrak beras hitam kaya akan senyawa bioaktif seperti antosianin dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Antosianin, pigmen alami yang memberikan warna gelap pada beras hitam, telah terbukti efektif dalam melawan stres oksidatif dengan cara menetralkan radikal bebas dan mengurangi akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS).

### 2.3.2. Peran Ekstrak Beras Hitam sebagai Antioksidan

Beras hitam telah dilaporkan memiliki sifat antioksidan. Ekstrak antosianin beras hitam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, mengurangi tingkat ROS, dan mengurangi akumulasi malondialdehid pada sel yang terpapar stres oksidatif seperti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selain itu, ekstrak beras hitam telah terbukti memperpanjang umur, meningkatkan resistensi terhadap stres, dan mengurangi akumulasi lipofuscin pada organisme seperti *C. elegans* dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan menurunkan tanda-tanda kerusakan oksidatif.<sup>21,22,29,31</sup>

Kapasitas antioksidan dari ekstrak beras hitam terkait dengan kemampuannya untuk mengatur ekspresi gen yang terkait dengan jalur penuaan dan respons terhadap stres. Pemberian ekstrak telah terbukti menurunkan ekspresi mRNA *age-1* dan *daf-2* sambil meningkatkan tingkat mRNA *daf-16* dan meningkatkan ekspresi

protein antioksidan seperti SOD-3, CTL-1, dan GST-4. Studi *docking molekuler* menyarankan bahwa jalur insulin dapat berperan dalam memediasi efek perpanjangan umur antosianin beras hitam.<sup>18,22</sup>

## 2.4. *Hiperpigmentasi*

### 2.4.1. Definisi

*Hiperpigmentasi* adalah penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. *Photoaging* berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan<sup>44</sup>.

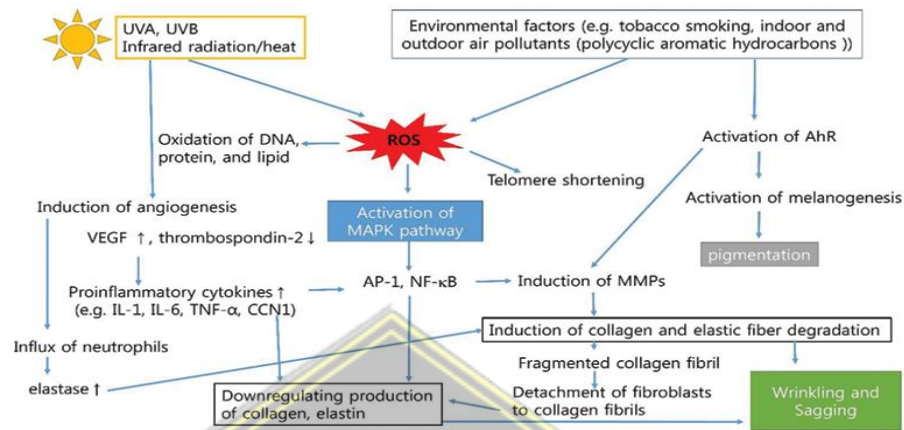
### 2.4.2. Proses *Hiperpigmentasi*

*Hiperpigmentasi* akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejanan kronis sinar UVB dan UVB sangat berperan dalam terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*<sup>45</sup>. Kerusakan kulit pada *photoaging* dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami *photoaging* dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna<sup>46</sup>. Kolagen merupakan bagian terbesar dari

lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit berupa kerutan (*wrinkle*), hilangnya elastisitas, kekenduran (*sagging*) dan pigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.

Dua regulator utama pada proses pembentukan kolagen oleh sel fibroblas adalah *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) dan *activator protein* (AP-1). TGF- $\beta$  merupakan sitokin yang merangsang produksi kolagen, sedangkan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. Penuaan ekstrinsik yang terutama disebabkan oleh radiasi sinar UVB (*photoaging*) akan menyebabkan peningkatan produksi ROS pada lapisan dermis. ROS tersebut akan memicu serangkaian reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1 yang akan menstimulasi proses transkripsi enzim MMP yang berperan dalam proses degradasi kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- $\beta$ . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit <sup>47-50</sup> Skema

patofisiologi penuaan kulit baik ekstrinsik dapat diringkas pada gambar 2.6. berikut ini.



**Gambar 2.2.** Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB<sup>8</sup>

## 2.5. Efek Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen IL-1 $\beta$ dan MITF

Ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Potensi antioksidan ekstrak beras hitam dapat menekan kadar ROS.<sup>20</sup> Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak beras hitam dapat menurunkan regulasi produksi IL-1 $\beta$ .<sup>23</sup> Ekstrak air beras hitam dosis 50  $\mu\text{g/mL}$  mempunyai aktivitas anti inflamasi paling luas yang ditunjukkan dengan peningkatan sel Treg, penurunan aktivitas faktor inti kappa B pada sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T, penurunan produksi TNF- $\alpha$  oleh sel T CD4<sup>+</sup>, penurunan produksi IL-6 dan IFN- $\gamma$  oleh makrofag.<sup>51</sup> Penurunan regulasi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$  oleh ekstrak beras secara tidak langsung dapat berdampak pada ekspresi MITF. MITF adalah pengatur utama perkembangan dan fungsi melanosit, dan ekspresinya dapat dipengaruhi oleh mediator inflamasi. Penggunaan senyawa antioksidan dapat mencegah

aktivasi jalur MITF yang menyebabkan tyrosinase tidak aktif dan berdampak pada pencegahan produksi melanin berlebihan.<sup>52</sup>

Beberapa penelitian ilmiah telah menunjukkan potensi senyawa antioksidan dalam menghambat aktivitas MITF sehingga berdampak pada penghambatan enzim tyrosinase, yang bertanggung jawab atas produksi melanin<sup>53</sup>. Penghambatan aktivitas tyrosinase oleh antioksidan dapat membantu mengontrol produksi melanin dan mencegah terjadinya hiperpigmentasi. Selain itu, antioksidan juga dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan DNA oleh sinar UVB<sup>53</sup>. Paparan sinar matahari yang berlebihan dapat merusak DNA kulit, yang dapat menyebabkan munculnya hiperpigmentasi. Dalam hal ini, ekstrak beras hitam menghambat ekspresi tyrosinase dan MMPs yang mencegah terjadinya pigmentasi dan degradasi kolagen pada model sel kulit yang teradiasi UVB.<sup>19,32</sup>

Meskipun terdapat beberapa bukti tentang potensi antioksidan ekstrak beras hitam untuk mengurangi hiperpigmentasi melalui aktivitas antioksidan dan antiinflamasi, masih diperlukan lebih banyak penelitian ilmiah yang mendalam. Hal ini termasuk penelitian terhadap mekanisme aksi yang lebih rinci, efektivitas, dan keamanan penggunaannya dalam produk perawatan kulit yang ditujukan untuk mengurangi hiperpigmentasi.



## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

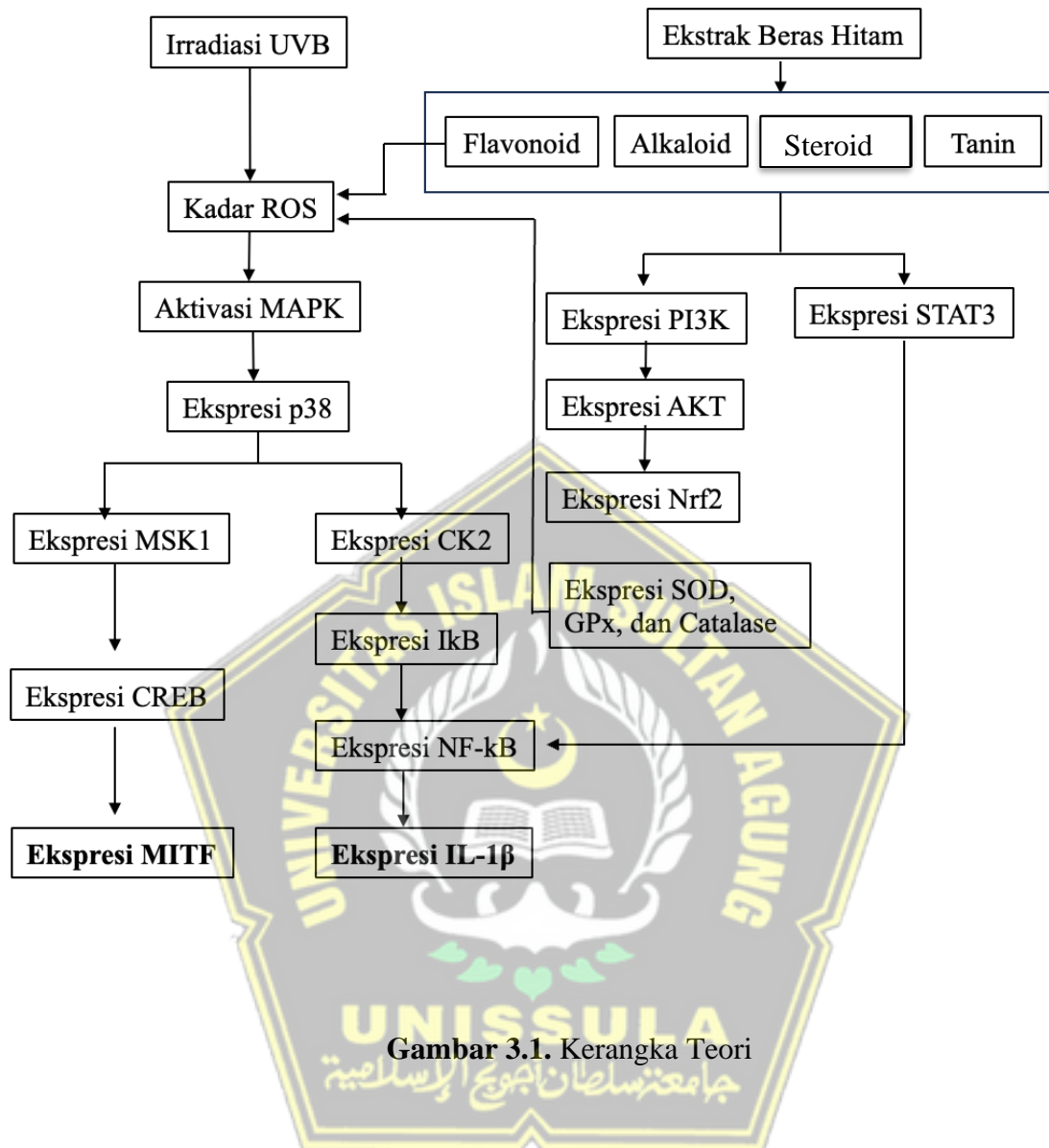
#### 3.1. Kerangka Teori

Hiperpigmentasi yang ditandai dengan hilangnya elastisitas kulit dan peningkatan produksi melanin adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UVB.<sup>2</sup> Mekanisme hiperpigmentasi pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS.<sup>54</sup> 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 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).<sup>55</sup> MAPK adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi c-Fos, p38 dan c-Jun *NH2-terminal kinase* (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun.<sup>56,57</sup> Aktivasi p38 akan mengaktifkan dua jalur yaitu *mitogen and stress-activated kinases* (MSK1) dan *protein kinase CK2* (CK2).<sup>58,59</sup> Jalur p38 MAPK yang terlibat pada aktivasi MSK1, dapat menyebabkan fosforilasi faktor transkripsi seperti *cAMP response element binding protein* (CREB) dan MITF.<sup>4,60</sup> Aktivasi MITF akan menginduksi melanogenesis sehingga terbentuk hiperpigmentasi.

Aktivasi jalur p38 MAPK yang terlibat dalam stres oksidatif dan apoptosis yang diinduksi UVB menginduksi interaksi yang kompleks antara p38 MAPK dan CK2, sehingga menstimulasi IKK kinase yang

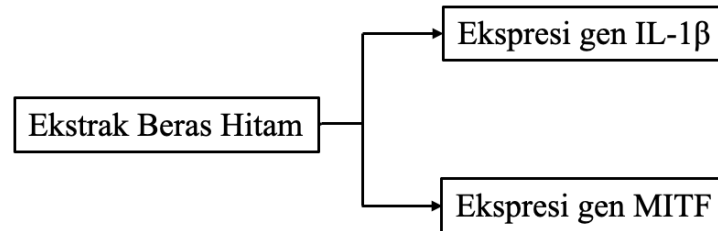
memfosforilasi I $\kappa$ B, menyebabkan NF- $\kappa$ B bertranslokasi ke dalam nucleus. Translokasi NF- $\kappa$ B ke nucleus ini menginduksi aktivasi faktor transkripsi berbagai sitokin pro-inflammasi seperti IL-1 $\beta$  dan mengakibatkan sintesis melanin.<sup>61</sup>

Ekstrak beras hitam diketahui memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflammasi dengan menginduksi ekspresi *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K). PI3K yang teraktivasi akan menginduksi ekspresi AKT dan mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2).<sup>17,22</sup> Senyawa flavonoid yang terkandung juga dalam ekstrak beras hitam dengan mentransfer elektron secara langsung kepada radikal untuk membentuk spesies kurang reaktif.<sup>62,63</sup> Aktivasi Nrf2 akan bertranslokasi ke nucleus sehingga dapat menginduksi pelepasan enzim-enzim antioksidan dan menekan produksi ROS. Senyawa ekstrak beras hitam juga menghambat ekspresi STAT3<sup>51</sup> sehingga menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B yang dapat menekan pelepasan sitokin pro-inflammasi dan melanogenesis.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

### 3.2. Kerangka Konsep



**Gambar 3.2.** Kerangka Konsep

### 3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada tikus jantan galur *C57BL/6J* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

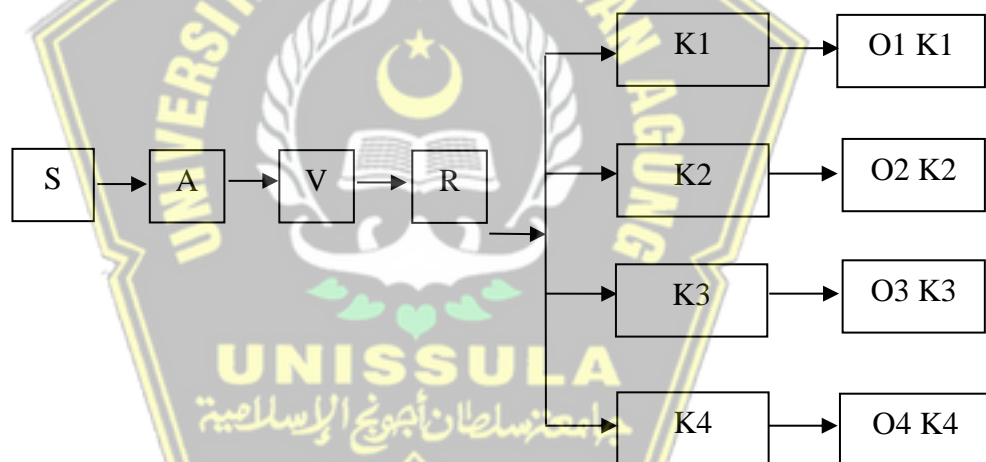


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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



**Gambar 4.1.** Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1 : Tikus Sehat

Perlakuan : K2: Kontrol Negatif (Tikus model hiperpigmentasi dengan induksi sinar UVB tanpa pemberian terapi)

Perlakuan : K3: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian ekstrak beras hitam dosis 7,5%.

Perlakuan : K4: Tikus model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian ekstrak beras hitam dosis 15%.

O : Observasi

## 4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1. Variabel Penelitian

#### 4.2.1.1. Variabel Bebas

Krim ekstrak beras hitam yang diberikan secara topikal

#### 4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan ekspresi gen MITF

#### 4.2.1.3. Variabel Prekondisi

Paparan sinar UVB

### 4.2.2. Defenisi Operasional

#### 4.2.2.1. Ekstrak beras hitam

Ekstrak beras hitam adalah ekstrak kental etanol dari beras hitam kering yang diproduksi dengan metode maserasi selama 72 jam dan di evaporasi dengan menggunakan rotary vacuum evaporator. Ekstrak beras hitam diberikan secara topikal dalam bentuk sediaan gel dengan dosis 7,5% dan 10%.

Satuan: gram

Skala: rasio

#### 4.2.2.2. Ekspresi gen IL-1 $\beta$

Ekspresi gen IL-1 $\beta$  adalah rasio ekspresi gen protein sitokin proinflammasi yang teraktivasi pada hari 14 setelah awal pemberian perlakuan yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level IL-1 $\beta$  /GAPDH

Skala: rasio

#### 4.2.2.3. Ekspresi gen MITF

Ekspresi gen MITF adalah ekspresi gen yang berperan dalam mengatur diferensiasi dan proliferasi sel-sel melanosit, yang merupakan sel-sel yang menghasilkan pigmen melanin. Ekspresi gen MITF dianalisis dari jaringan kulit pada hari ke 14 setelah awal pemberian perlakuan yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH dan ekspresi gen dianalisis dengan metode qRT-PCR.

Satuan: Rasio mRNA level MITF /GAPDH

Skala: rasio

### 4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

#### 4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur C57BL/6J berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang dipapar

sinar UVB sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm<sup>2</sup> yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 20 cm.

#### 4.3.2. Sampel Penelitian

##### 4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Kondisi sehat.
2. Tikus belum pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

##### 4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur C57BL/6J dengan kriteria:

1. Tikus sakit selama penelitian yang terlihat dengan aktivitas tikus melemah

##### 4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

#### 4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur C57BL/6J dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sehat (tikus sehat tanpa penuaan dini akibat paparan UVB), Kontrol negatif (tikus model yang dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 (tikus



model dipapar UVB dan diberi ekstrak beras hitam secara topikal dosis 7,5%) dan Perlakuan 2 (tikus model dipapar UVB dan diberi ekstrak beras hitam secara topikal dosis 15%).

#### 4.3.4. Besar Sampel

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 6$$

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

#### 4.4. Alat dan Bahan

##### 4.4.1. Alat

Pelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 390 mJ/cm<sup>2</sup>, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch,

sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

#### **4.4.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk perlakuan seperti ekstrak beras hitam, basis krim, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform.

### **4.5. Cara Penelitian**

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

*Ethical clearance* penelitian diperoleh dari Komisi Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

#### **4.5.2. Pembuatan Ekstrak Beras Hitam**

Ekstrak beras hitam diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 hari menggunakan ethanol 96% dengan perbandingan 1:4 (g/v). Maserat selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan waterbath suhu 80°C selama 24 jam untuk memperoleh ekstrak kental.

#### **4.5.3. Pembuatan Krim Ekstrak Beras Hitam**

Fase minyak yang terdiri dari olive oil, vaselinalbum, dimethicone, setil alkohol, isoprophyl myristate, dan span-80 dicampurkan menjadi satu dalam cawan dan dilelehkan pada suhu

70°C. BHT selanjutnya dicampurkan pada fase minyak dan di aduk hingga homogen. Fase air terdiri dari propylparaben, tween-80, methylparaben, and glyserin dilarutkan dalam air pada suhu 70°C. Fase minyak dan fase air dicampurkan bersama menggunakan homogenizer selama 15 menit dengan kecepatan 300rpm. Selanjutnya 7,5% dan 15% ekstrak beras hitam dicampurkan sedikit demi-sedikit hingga tercampur homogen dan didiamkan pada suhu ruangan hingga dingin.

**Tabel 4.1. Komposisi Krim Ekstrak Beras Hitam**

Bahan	Persentase
Olive oil	5%
Veaselin album	5%
Dimethicone	3%
Setil Alkohol	2%
Isoprophyl myristate	3%
Span-80	4%
BHT	1%
Propylparaben	0,1%
Tween-80	5%
Methyl paraben	0,3%
Glyserin	20%
Ekstrak beras hitam	7,5 dan 15%
Aqudest	Ad 100%

#### 4.5.4. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama lima hari dibius dengan dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm

3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 390 mJ/cm<sup>2</sup>/hari yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu dengan jarak lampu 15 cm selama 2 minggu. Pemberian krim ekstrak beras hitam dilakukan pada jam yang sama setiap hari yaitu jam 9 pagi dimulai pada hari ke-nol.
4. Tikus Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan krim ekstrak beras hitam dengan dosis 7,5% dan 15% sebanyak 100mg tiap tikus yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari selama penyinaran UV-B.

#### **4.5.5. Pengecekan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin**

Jaringan kulit di potong secara membujur untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan Fontana-Masson dengan tahapan pertama deparafinisasi slide jaringan dengan pemanasan cairan bouin ke 54-64°C. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide di hematigoksin besi weigert selama 5 menit. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit dan inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit, dilanjutkan dengan inkubasi slide dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit.

Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit dan diamati di bawah mikroskop. Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan di bandingkan kelompok sehat yang di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.<sup>30</sup>

#### **4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan**

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke 14 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan dibagi menjadi dua dan dilakukan pemotongan dengan arah pemotongan jaringan vertikal, sehingga bisa didapatkan semua lapisan jaringan kemudian difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Dan dimasukkan didalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

#### **4.5.7. Analisis Kuantitatif Ekspresi IL-1 $\beta$ dan MITF menggunakan RT-PCR**

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA<sup>64</sup> Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen

Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

2. Penentuan ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.
3. Perhitungan ekspresi gen ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.

#### **4.6. Tempat dan Waktu Penelitian**

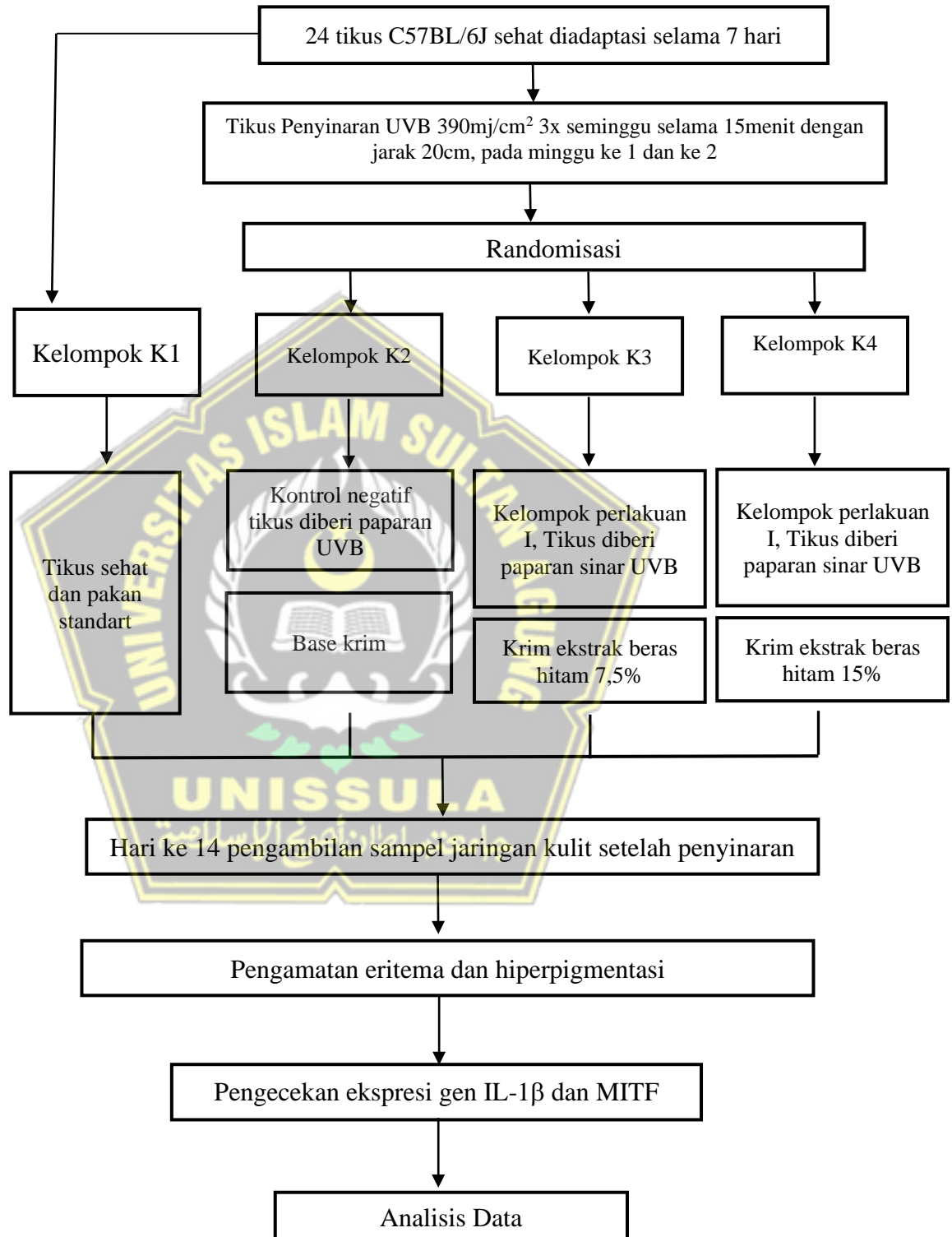
Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research Indonesia*. Penelitian dilakukan pada April – Juni 2024.

#### **4.7. Analisa Data**

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen

( $p > 0,05$ ), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ( $p > 0,05$ ) dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran data tidak normal ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.

#### 4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian



## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada kulit tikus yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang dilakukan dari Juni hingga Agustus 2024 di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research Indonesia. Subjek penelitian adalah tikus jantan *C57BL/6J* dengan berat 200-250 gram dan usia 2-2,5 bulan, yang dipaparkan sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm dan intensitas energi 390 mJ/cm<sup>2</sup> selama 15 menit, tiga kali seminggu selama dua minggu. Setelah itu, tikus diberi krim ekstrak beras hitam dengan konsentrasi 7,5% dan 15% selama 14 hari berturut-turut sebelum paparan UVB. Tikus *C57BL/6J* dipilih karena struktur kulitnya mirip dengan kulit manusia dan tidak terjadi abnormalitas produksi melanin, dan penggunaan tikus jantan bertujuan untuk menghindari faktor hormonal yang dapat mempengaruhi pelepasan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  dan MITF. Sebanyak 24 tikus digunakan dalam penelitian ini tanpa ada yang keluar dari penelitian. Penelitian dibagi menjadi empat kelompok: satu kelompok sehat, satu kelompok kontrol negatif, dan dua kelompok perlakuan. Kelompok sehat tidak mendapatkan perlakuan, kelompok kontrol negatif mendapatkan krim dasar tanpa ekstrak beras hitam, kelompok perlakuan pertama (K1) mendapatkan krim ekstrak beras hitam 7,5%, dan kelompok perlakuan kedua (K2) mendapatkan krim ekstrak beras hitam 15% selama 14 hari berturut-turut. Krim ekstrak beras hitam diaplikasikan secara topikal pada area kulit yang terpapar UVB secara merata.

## 5.1. Hasil Penelitian

### 5.1.1. Ekstraksi Beras Hitam dan Uji Kualitatif Skrining Fitokimia

Dalam penelitian ini, ekstrak beras hitam diperoleh melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol, menghasilkan rendemen sebesar 8,70%. Ekstrak tersebut memiliki tekstur kental, aroma seperti batang, dan berwarna coklat kehitaman. Selanjutnya, dilakukan analisis skrining fitokimia secara kualitatif terhadap ekstrak tersebut. Hasil skrining dengan reagen spesifik menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan tanin. Penelitian ini juga mengukur total flavonoid dalam ekstrak menggunakan metode spektrofotometri. Pada konsentrasi 1000 ppm, ekstrak mengandung flavonoid sebanyak  $90,30 \pm 4,02 \text{ mg/100g}$ . Selain itu, ekstrak beras hitam ini mengandung total fenolik sebesar  $14,64 \pm 0,40 \text{ mg/100g}$  dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $67,98 \pm 8,16 \text{ ppm}$ . Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam memiliki kandungan flavonoid yang tinggi.

**Tabel 5.1. Uji skrining fitokimia ekstrak beras hitam**

Parameter Uji	Hasil Uji (Kualitatif)	Metode
Alkaloid	Positif	Wagner
Saponin	Negatif	Forth
Tanin	Positif	FeCl <sub>3</sub> 1%
Flavonoid	Positif	Wilstater
Steroid	Positif	Liebermann-Burchard

**Tabel 5.2. Uji analisis kuantitatif kandungan ekstrak beras hitam**

Parameter Uji	Hasil Uji (Kualitatif)
Uji flavonoid total - spektrofotometri	90,30±4,02mg/100g
Uji fenolik total - spektrofotometri	14,64±0,40 mg/100g
Uji antioksidan – DPPH (IC50)	67,98±8,16 ppm

Pada penelitian ini hewan model hiperpigmentasi yang di papir irradiasi UVB 390 mJ/cm<sup>2</sup> terlihat perbedaan visual warna kulit tikus setelah hari ke 14 penyinaran sinar UVB. Hasil kulit pada kelompok perlakuan UVB menunjukkan terbentuk warna hitam pada bagian kulit (Gambar 5.1). Kondisi patogenesis hiperpigmentasi terkait paparan sinar UVB, salah satu indikator terpenting adalah melanogenesis. Melanin, dapat menyerap radiasi UVB dan memberikan fotoproteksi serta berinteraksi dengan keratinosit dalam proses sintesis melanin. Sintesis melanin berlebihan menginduksi kerusakan kulit dan hiperpigmentasi.



**Gambar 5.1.** Morfologi kulit hewan model diamati secara visual sebelum dan sesudah paparan UVB.

### 5.1.2. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen IL-1 $\beta$ Pada Tikus Galur C57BL/6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada kulit tikus dengan metode qRT-PCR pada hari ke-15 penelitian. Ekspresi gen IL-1 $\beta$  dianalisis pada ke 15 hewan model tikus pada setiap kelompok dan dilakukan analisis statistika uji normalitas *saphiro wilk* dan uji homogenitas *levene test* (Tabel 5.3).

**Tabel 5.3. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen IL-1 $\beta$  dan MITF**

Variabel	Kelompok				pvalue
	Kontrol sehat=6 Mean $\pm$ SD	Kontrol negatif n=6 Mean $\pm$ SD	Krim Ekstrak Beras Hitam 7,5% (P1) n=6 Mean $\pm$ SD	Krim Ekstrak Beras Hitam 15% (P2) n=6 Mean $\pm$ SD	
Ekspresi gen IL-1 $\beta$	1,05 $\pm$ 0,02	2,30 $\pm$ 0,15	0,79 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,05	
<i>Saphiro wilk</i>	0,130*	0,396*	0,477*	0,817*	
<i>Levene test</i>				0,021	
<i>One way ANOVA</i>				0,001***	
Ekspresi gen MITF	1,03 $\pm$ 0,01	2,09 $\pm$ 0,53	0,98 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,07	
<i>Shapiro wilk</i>	0,342*	0,030	0,412*	0,766*	
<i>Levene test</i>				0,001	
<i>Kruskall-Wallis</i>				0,009***	

Keterangan :

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

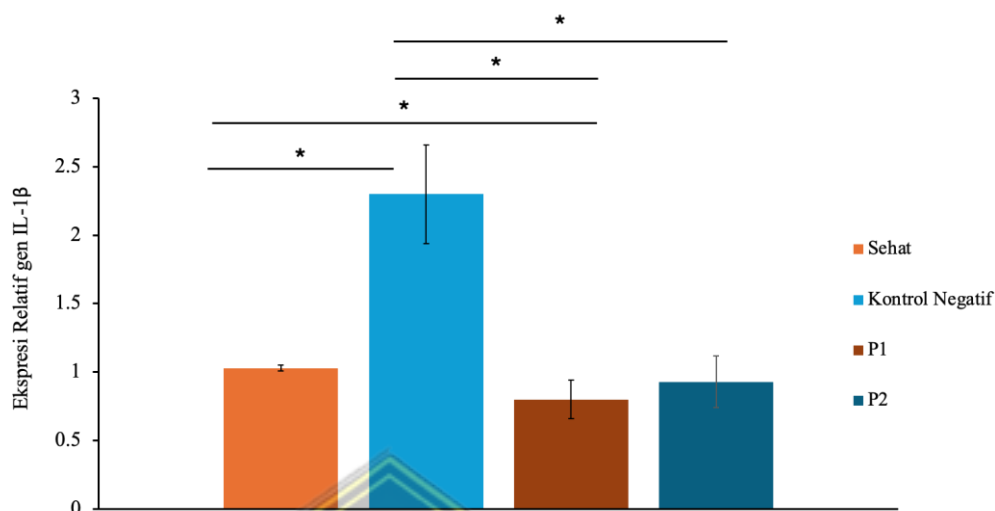
\*\* Levene's Test ( $p > 0,05$  = homogen)

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

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.3.

Rerata ekspresi gen IL-1 $\beta$  di kelompok krim ekstrak beras hitam (KEBH) dosis 7,5% yang terendah pada kelompok perlakuan yaitu 0,79 $\pm$ 0,06, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen IL-1 $\beta$  di kelompok KEBH 15% (0,87 $\pm$ 0,05). Ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada

kelompok sehat ( $1,05 \pm 0,02$ ) dan kelompok kontrol negatif meningkat sebesar ( $2,30 \pm 0,15$ ) memiliki nilai lebih tinggi dari kelompok sehat yang membuktikan bahwa paparan sinar UVB meningkatkan sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$ . Data ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada semua kelompok penelitian terdistribusi normal yang ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai  $p > 0,05$ . Data penelitian ekspresi gen IL-1 $\beta$  memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai  $p = 0,021$  ( $p < 0,05$ ). Distribusi dan varian data ekspresi gen IL-1 $\beta$  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 gen IL-1 $\beta$  yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.3). Berdasarkan hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa pemberian KEBH dapat menurunkan ekspresi gen IL-1 $\beta$  secara efektif pada dosis 7,5% dan 15% pada tikus B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.



**Gambar 5.2.** Grafik ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada seluruh kelompok penelitian. Rata-rata  $\pm$  SD, \* ( $p < 0,05$ ): berbeda signifikan.

**Tabel 5.4.** Uji *post hoc* Tamhane ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,002*
	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,031*
	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,051
Kontrol negatif	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,001*
	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,001*
Krim ekstrak beras hitam 7,5%	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,933

Tanda \* menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

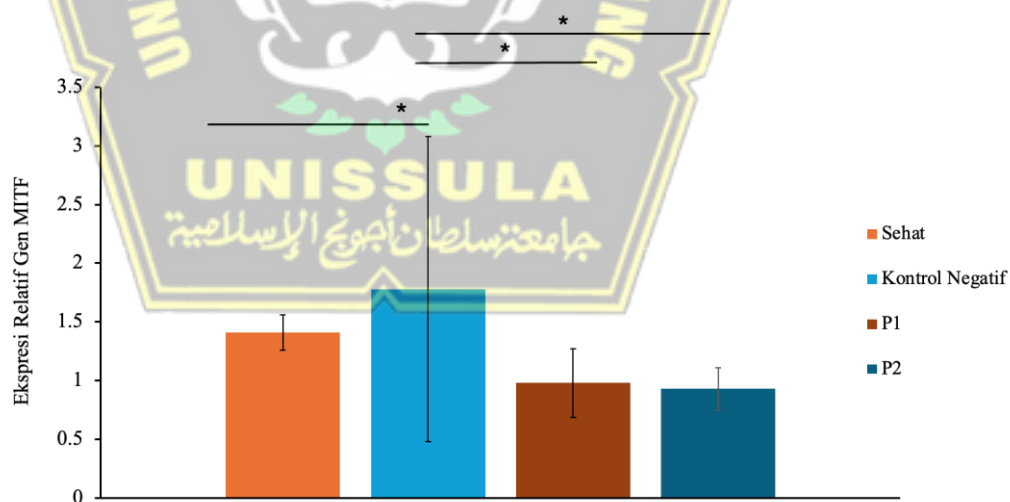
Berdasarkan data di atas didapatkan perbandingan rerata kontrol sehat dengan kontrol negatif memiliki nilai signifikan  $p=0,002$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak beras hitam 7,5% memiliki nilai signifikan  $p=0,001$  ( $p > 0,05$ ) dan terhadap krim ekstrak beras hitam 15% (0,001) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak beras hitam

7,5% terhadap krim ekstrak beras hitam 15% memiliki nilai  $p=0,933$  ( $p>0,05$ ) yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Secara keseluruhan pemberian krim ekstrak beras hitam dapat meningkatkan ekspresi gen IL-1B secara efektif dosis 15% pada tikus B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

### **5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi gen MITF Pada Tikus Galur B6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB**

*Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) adalah faktor yang paling penting untuk regulasi melanogenesis dan fungsi melanosit pada kulit<sup>65</sup>. MITF tidak hanya mengatur ekspresi gen enzim melanogenik termasuk tirosinase dan *tyrosinase-related protein-1/2* (TRP1/2), tetapi juga perkembangan dan proliferasi sel melanosit<sup>66</sup>. Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.3. Rerata ekspresi gen MITF di kelompok KEBH 15% yang terendah ( $0,93\pm 0,07$ ). Pada kelompok kontrol negatif terjadi peningkatan ekspresi gen MITF tertinggi hingga  $2,09\pm 0,53$ . Pemberian krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% memiliki trend menurunkan ekspresi gen MITF. Pada krim ekstrak beras hitam 7,5% mengalami penurunan ekspresi gen MITF menjadi  $0,98\pm 0,11$  dan pada kelompok sehat sebagai baseline memiliki ekspresi gen MITF sebesar  $1,03\pm 0,01$ . Hasil uji normalitas dengan *Shapiro-wilk* diperoleh data pada kelompok selain kelompok kontrol negatif

terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ , namun pada kelompok kontrol negatif memiliki nilai  $p = 0,030$  yang berarti tidak terdistribusi normal. Data penelitian ekspresi gen MITF memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai  $p = 0,001$  ( $p > 0,05$ ). Distribusi dan varian data ekspresi gen MITF adalah terdistribusi tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskall Wallis* menghasilkan nilai  $p = 0,009$  ( $p < 0,05$ ) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen MITF yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.3). Hasil uji *Kruskall Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



**Gambar 5.3.** Grafik ekspresi gen MITF pada seluruh kelompok penelitian. Rata-rata  $\pm$  SD, \* ( $p < 0,05$ ): berbeda signifikan.



**Tabel 5.5. Uji *Mann Whitney* ekspresi gen MITF pada masing-masing Kelompok**

<b>Kelompok</b>	<b>Kelompok Perbandingan</b>	<b>Sig</b>
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,002*
	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,394
Kontrol negatif	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,240
	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,026*
Krim ekstrak beras hitam 7,5%	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,004*
Krim ekstrak beras hitam 7,5%	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,818

Tanda \* menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data di atas didapatkan perbandingan rerata kontrol normal dengan kontrol negatif memiliki nilai signifikan  $p=0,002$  ( $p<0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak beras hitam 7,5% memiliki nilai signifikan  $p=0,026$  ( $p<0,05$ ) dan terhadap kelompok krim ekstrak beras hitam 15% juga memiliki nilai  $p<0,05$  (0,004), hal ini menunjukkan antara kelompok tersebut terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% memiliki nilai  $p=0,818$  ( $p>0,05$ ) yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan. Secara keseluruhan pemberian krim ekstrak beras hitam 15% dapat menurunkan ekspresi gen MITF secara signifikan jika di bandingkan dengan kelompok kontrol negatif pada pada tikus B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

## 5.2. Pembahasan

Paparan iradiasi UVB adalah faktor resiko utama fotoaging kulit yang berakibat hiperpigmentasi, ditandai dengan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi sehingga menginduksi aktivasi protein pembentuk melanin seperti MITF<sup>67</sup>. Iradiasi sinar UVB menginduksi kerusakan DNA melalui pembentukan ROS oksidatif, yang mengakibatkan aktivasi beberapa jalur sintesis melanin<sup>68</sup>. Terapi saat ini tidak semuanya memberikan hasil maksimal terutama dalam mencegah hiperpigmentasi kulit, beberapa agen menimbulkan efek samping merugikan seperti genotoksisitas dan iritasi kulit<sup>69</sup>. Penelitian terkini membuktikan bahwa krim ekstrak beras hitam mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tannin, dan steroid memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang mampu memperbaiki dan menginduksi regenerasi kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF yang berperan dalam jalur sintesis melanin pada tikus model hiperpigmentasi. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur B6J yang di induksi paparan sinar UVB 302 nm dengan intensitas energi 390mJ/cm<sup>2</sup> sebanyak tiga kali seminggu selama 2 minggu<sup>67</sup>.

Produksi IL-1 $\beta$  setelah paparan UVB melibatkan beberapa jalur sinyal yaitu jalur sinyal NF- $\kappa$ B sebagai salah satu jalur kunci, yang diaktifkan oleh radiasi UVB dan mengarah pada produksi sitokin proinflamasi<sup>70,71</sup>. Penekanan ekspresi lipin-1 oleh radiasi UVB melalui aksis sinyal AMPK/JNK/SREBP-1 dapat memodulasi produksi IL-1 $\beta$ <sup>72</sup>. Sinar UVB

juga menyebabkan kerusakan oksidatif DNA akibat peningkatan ROS yang ditandai dengan aktivasi NF- $\kappa$ B untuk memproduksi sitokin proinflamasi<sup>73</sup>. Pemberian senyawa antiinflamasi dan antioksidan dapat menurunkan sitokin proinflamasi sehingga menunjukkan efek protektif yang baik pada kulit<sup>74,75</sup>. Penurunan stres oksidatif akibat paparan sinar UVB akut dapat dicegah dengan berbagai senyawa yang mampu menyeimbangkan radikal seperti senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin<sup>76</sup>. Pada penelitian ini senyawa flavonoid terbukti positif pada ekstrak beras hitam, dengan konsentrasi 90,30mg/100g ekstrak. Adanya kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, dan steroid pada krim ekstrak beras hitam tersebut terbukti dapat menurunkan ekspresi IL-1 $\beta$  dan MITF pada kulit tikus hiperpigmentasi yang terpapar sinar UVB.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen IL-1 $\beta$  dan MITF pada kelompok krim ekstrak beras hitam 7,5% dan krim ekstrak beras hitam 15% mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan kelompok tikus hiperpigmentasi yang tidak mendapatkan terapi (Kontrol negatif). Hal ini menunjukan bahwa penurunan ekspresi gen MITF dapat mencegah hiperpigmentasi. Senyawa flavonoid yang berasal dari ekstrak beras hitam mungkin dapat menghambat TGF- $\beta$  sehingga menghambat aktivitas MITF melalui penghambatan jalur PI3K/Akt<sup>18,32</sup>. Penekanan TGF- $\beta$  berpotensi menghambat biosintesis melanin pada sel melanoma B16. Kemampuan senyawa flavonoid menghambat TGF- $\beta$  juga telah dilaporkan dapat menghambat jalur cAMP / protein kinase A dan menginduksi GLI2, yang

kemudian menekan MITF, faktor transkripsi sentral melanogenesis.<sup>77</sup> Sedangkan melalui jalur SMAD, penekanan TGF- $\beta$  dalam menghambat proses melanogenesis dengan mengirimkan sinyal melalui reseptor heteromerik spesifik ligan, yaitu reseptor serin/treonin kinase yang berfungsi untuk fosforilasi dan aktivasi reseptor (R)-Smad, yang mengarah ke pembentukan kompleks dengan (Co)-Smad, Smad4, dan regulasi transkripsi dari gen target sehingga menekan ekspresi MITF<sup>78</sup>.

Penurunan aktivitas MITF terbukti bertanggung jawab pada penurunan kandungan pigmen kulit dengan mendegradasi TRP-1<sup>66,67</sup>. TGF- $\beta$  yang diinduksi oleh senyawa metabolit sekunder berdasarkan penelitian terdahulu dilaporkan dapat menghambat jalur cAMP / protein kinase A dan menginduksi GLI2, yang kemudian menekan MITF, faktor transkripsi sentral melanogenesis<sup>18,22</sup>. Sedangkan melalui jalur SMAD, TGF- $\beta$  dalam menghambat proses melanogenesis dengan mengirimkan sinyal melalui reseptor heteromerik spesifik ligan, yaitu reseptor serin/treonin kinase yang berfungsi untuk fosforilasi dan aktivasi reseptor (R)-Smad, yang mengarah ke pembentukan kompleks dengan (Co)-Smad, Smad4, dan regulasi transkripsi dari gen target sehingga menekan ekspresi MITF<sup>79</sup>.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pengobatan sel melanoma dengan menekan IL-1 $\beta$  menggunakan senyawa flavonoid atau alkaloid, menyebabkan penghambatan ekspresi MITF melalui aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dan JNK.<sup>25,60</sup> Inaktivasi kedua jalur ini dapat menghilangkan efek penghambatan IL-1 $\beta$  pada melanin, yang menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  dapat

menurunkan regulasi MITF melalui jalur NF-kB dan JNK, sehingga menghambat melanogenesis<sup>80</sup>. Disisi lain oksidatif stress (ROS) adalah penyebab utama hiperpigmentasi yang menginduksi pelepasan ekspresi protein pengatur sintesis melanin seperti MITF, TRP-1, dan TRP-2<sup>81,82</sup>. Flavonoid menekan ROS dan menghambat aktivasi NF-kB untuk mengaktifkan jalur sintesis melanin<sup>83,84</sup>. struktur C-6 pada flavonoid menghambat ekspresi NF-kB *signaling pathway*<sup>85</sup>. Secara keseluruhan penelitian ini sudah berhasil membuktikan bahwa krim ekstrak beras hitam memiliki fungsi sebagai antioksidan dan antinflamasi yang dapat melindungi kulit akibat radikal bebas dari UVB akut. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pengembangan penggunaan krim ekstrak beras hitam dosis 15% dalam menelusuri mekanisme molekuler terfokus pada jalur produksi melanin.

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan jaringan akibat paparan sinar UVB. Aktivasi ROS dalam menginduksi ekspresi MITF, TRP-1, dan TRP-2 pada sel melanosit melalui jalur NF-kB, MAPK, dan JNK juga tidak diamati pada penelitian ini. Penelitian ini juga tidak mengamati aktivitas secara molekuler yang terjadi pada sel melanosit secara *in vivo*.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka dapat disimpulkan :

1. Terdapat pengaruh secara signifikan pemberian krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% dan 15% secara topikal terhadap ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.
2. Terdapat pengaruh secara signifikan pemberian krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% dan 15% secara topikal terhadap ekspresi gen MITF pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

#### 6.2. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan analisis mekanisme molekuler aksi krim ekstrak beras hitam pada jalur produksi melanin.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis kadar ROS akibat pemberian krim ekstrak beras hitam pada model hiperpigmentasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- 1 Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C *et al.* Changes of MMP-1 and collagen type I $\alpha$ 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 633–637.
- 2 Wölfle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 3 Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 406–414.
- 4 Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ETH *et al.* Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 2000; **255**: 135–143.
- 5 Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2009; **14**: 20–24.
- 6 Mirastschijski U, Lupše B, Maedler K, Sarma B, Radtke A, Belge G *et al.* Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF- $\alpha$ -induced collagen degradation in skin. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1–14.
- 7 You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC *et al.* Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants* 2019; **8**: 1–16.
- 8 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
- 9 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
- 10 Padhi S, Sarangi RL, Ramdas A, Ravichandran K, Varghese RGB, Alexander T *et al.* Cutaneous hyperpigmentation in megaloblastic anemia: A five year retrospective review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; **8**. doi:10.4084/MJHID.2016.021.

- 11 García-Gavín J, González-Vilas D, Fernández-Redondo V, Toribio J. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis* 2010; **62**: 63–64.
- 12 Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
- 13 Sarkar R, Bhalla M, Kanwar AJ. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatology* 2002; **205**: 249–254.
- 14 Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients* 2016; **8**: 8–11.
- 15 Ghasemzadeh A, Karbalaii MT, Jaafar HZE, Rahmat A. Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chem Cent J* 2018; **12**. doi:10.1186/s13065-018-0382-9.
- 16 Hetharia GE, Briliannita A, Astuti M, Marsono Y. Antioxidant extraction based on black rice (*Oryza Sativa L. Indica*) to prevent free radical. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Institute of Physics Publishing, 2020 doi:10.1088/1757-899X/823/1/012002.
- 17 Sangkaew O, Yompakdee C. Fermented unpolished black rice (*Oryza sativa L.*) inhibits melanogenesis via ERK, p38, and AKT phosphorylation in B16F10 melanoma cells. *J Microbiol Biotechnol* 2020; **30**: 1184–1194.
- 18 Jufri M, Vardhani A, Purwaningsih E. Evaluating the efficacy of lotion containing black rice bran (*Oryza sativa L. indica*) extract as skin brightening agent: A clinical trial. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2021; **16**. doi:10.5812/jjnpp.114152.
- 19 Miyazawa M, Oshima T, Koshio K, Itsuzaki Y, Anzai J. Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 6953–6956.
- 20 Peng B, Lou A-Q, Luo X-D, Wang R, Tu S, Xue Z-Y *et al*. The Nutritional Value and Application of Black Rice-A Review. *Journal of Biotechnology Research* 2021; : 63–72.
- 21 Li X, Wang X, Wang K, Yang X, Liu X, Chen J *et al*. Black rice anthocyanin extract enhances the antioxidant capacity in PC12 cells and improves the lifespan by activating IIS pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 2023; **265**. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109533.



- 22 Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; **16**: 4277–4283.
- 23 Yu S, Park H, Kim W. Anti-inflammaging effects of black soybean and black rice mixture extract by reprogramming of mitochondrial respirations in murine macrophages. *J Funct Foods* 2022; **94**. doi:10.1016/j.jff.2022.105114.
- 24 Shin JM, Kim MY, Sohn KC, Jung SY, Lee HE, Lim JW *et al.* Nrf2 negatively regulates melanogenesis by modulating PI3K/Akt signaling. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0096035.
- 25 Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ *et al.* Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**: 617–622.
- 26 Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15.
- 27 Wang CQF, Akalu YT, Suarez-Farinas M, Gonzalez J, Mitsui H, Lowes MA *et al.* IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: Potential relevance to psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; **133**: 2741–2752.
- 28 Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 2017; **112**: 1–14.
- 29 Hwang SN, Kim JC, Bhuiyan MIH, Kim JY, Yang JS, Yoon SH *et al.* Black rice (*Oryza sativa* L., poaceae) extract reduces hippocampal neuronal cell death induced by transient global cerebral ischemia in mice. *Exp Neurobiol* 2018; **27**: 129–138.
- 30 Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *et al.* Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci* 2022; **10**: 1–7.

- 31 VARDHANI A, JUFRI M, PURWANINGSIH E. POTENCY OF  $\Gamma$ -ORYZANOL-RICH BLACK RICE BRAN (ORYZA SATIVA L. INDICA) EXTRACT FOR TYROSINASE INHIBITION. *Int J Pharm Pharm Sci* 2020; : 90–93.
- 32 Han M, Bae JS, Ban JJ, Shi HS, Lee DH, Chung JH. Black rice (*Oryza sativa* L.) extract modulates ultraviolet-induced expression of matrix metalloproteinases and procollagen in a skin cell model. *Int J Mol Med* 2018; **41**: 3073–3080.
- 33 Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 2015; **135**: 352–358.
- 34 Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Mol Cancer* 2020; **19**: 1–12.
- 35 Oh TI, Yun JM, Park EJ, Kim YS, Lee YM, Lim JH. Plumbagin suppresses  $\alpha$ -MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. *Int J Mol Sci* 2017; **18**. doi:10.3390/ijms18020320.
- 36 Chen T, Zhao B, Liu Y, Wang R, Yang Y, Yang L *et al.* MITF-M regulates melanogenesis in mouse melanocytes. *J Dermatol Sci* 2018; **90**: 253–262.
- 37 Villareal MO, Kume S, Neffati M, Isoda H. Upregulation of Mitf by Phenolic Compounds-Rich *Cymbopogon schoenanthus* Treatment Promotes Melanogenesis in B16 Melanoma Cells and Human Epidermal Melanocytes. *Biomed Res Int* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8303671.
- 38 Slominski A. L-tyrosine and L-DOPA as hormone-like regulators of melanocytes functions. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **72**: 181–204.
- 39 Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; **22**: 189–195.
- 40 Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009; **60**: 57–64.
- 41 Yang CY, Guo Y, Wu WJ, Man MQ, Tu Y, He L. UVB-Induced Secretion of IL-1  $\beta$  Promotes Melanogenesis by Upregulating TYR/TRP-1 Expression In Vitro. *Biomed Res Int* 2022; **2022**. doi:10.1155/2022/8230646.
- 42 Kulkarni NN, Adase CA, Zhang L Juan, Borkowski AW, Li F, Sanford JA *et al.* IL-1 Receptor–Knockout Mice Develop Epidermal Cysts and Show

- an Altered Innate Immune Response after Exposure to UVB Radiation. *Journal of Investigative Dermatology* 2017; **137**: 2417–2426.
- 43 D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 2013; **14**: 12222–12248.
- 44 Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**: 1–19.
- 45 Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol* 2019; **28**: 23–27.
- 46 Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**: 1–14.
- 47 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 1–11.
- 48 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing / Dermatology Nurses’ Association* 2008; **20**.
- 49 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci* 2008; **30**: 87–95.
- 50 Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Lab Anim Res* 2011; **27**: 1.
- 51 Hartati FK, Widjanarko SB, Widyaningsih TD, Rifa’i M. Anti-Inflammatory evaluation of black rice extract inhibits TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 cytokines produced by immunocompetent cells. *Food Agric Immunol* 2017; **28**: 1116–1125.
- 52 Ramli S, Ruangrunsi N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. 2021.
- 53 Varela MT, Ferrarini M, Mercaldi VG, Sufi B da S, Padovani G, Nazato LIS *et al*. Coumaric acid derivatives as tyrosinase inhibitors: Efficacy studies through in silico, in vitro and ex vivo approaches. *Bioorg Chem* 2020; **103**: 104108.

- 54 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**: 2528–2540.
- 55 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**. doi:10.3390/nu11061341.
- 56 Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012; **1820**: 1693–1703.
- 57 Currò M, Risitano R, Ferlazzo N, Cirimi S, Gangemi C, Caccamo D *et al.* Citrus bergamia Juice Extract Attenuates  $\beta$ -Amyloid-Induced Pro-Inflammatory Activation of THP-1 Cells Through MAPK and AP-1 Pathways. *Sci Rep* 2016; **6**: 1–11.
- 58 Baumann D, Drebant J, Hägele T, Burger L, Serger C, Lauenstein C *et al.* P38 MAPK signaling in M1 macrophages results in selective elimination of M2 macrophages by MEK inhibition. *J Immunother Cancer* 2021; **9**. doi:10.1136/jitc-2020-002319.
- 59 Yoshida M, Clinic Y, Arai T, Kagaku D, Kabushiki K, Hoshino S *et al.* IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induction of Type I Collagen mRNA Expression via Both JNK and p38 Pathways in Human Lung Fibroblasts Original article : IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor -  $\beta$  - Induction of Type I Collagen mRNA Expressio. 2005. doi:10.17877/DE290R-8281.
- 60 Alam MB, Bajpai VK, Lee JI, Zhao P, Byeon JH, Ra JS *et al.* Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–12.
- 61 Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of smad2/3-dependent signaling pathways: Potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med* 2013; **31**: 1148–1152.
- 62 Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018; **54**: 287–293.

- 63 Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 2015; **74**: 10–36.
- 64 Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, Miller KJ, Ehanire T, Quiles C *et al.* A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair and Regeneration* 2014; **22**: 755–764.
- 65 Chen T, Zhao B, Liu Y, Wang R, Yang Y, Yang L *et al.* MITF-M regulates melanogenesis in mouse melanocytes. *Journal of Dermatological Science* 2018; **90**: 253–262.
- 66 Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ *et al.* Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; **3**: 617–622.
- 67 You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC *et al.* Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants* 2019; **8**: 1–16.
- 68 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sciences* 2018; **210**: 201–208.
- 69 Cheng SL, Liu RH, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, Tsay GJ. Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *Journal of Biomedical Science* 2007; **14**: 87–105.
- 70 Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 325–334.
- 71 Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- $\alpha$  production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **129**: 994–1001.
- 72 Egrilmez MY, Kocturk S, Aktan S, Oktay G, Resmi H, Keskin HS *et al.* Melatonin Prevents UVB-Induced Skin Photoaging by Inhibiting Oxidative Damage and MMP Expression through JNK/AP-1 Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *Life* 2022; **12**. doi:10.3390/life12070950.
- 73 Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of

- Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8379539.
- 74 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
- 75 Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 2014; **23**: 239–244.
- 76 Brunetti C, di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *Int J Mol Sci*. 2013; **14**: 3540–3555.
- 77 Lee SE, Park SH, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al*. Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- $\alpha$ /p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–12.
- 78 Pierrat MJ, Marsaud V, Mauviel A, Javelaud D. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 17996–18004.
- 79 Pierrat MJ, Marsaud V, Mauviel A, Javelaud D. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 17996–18004.
- 80 Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L *et al*. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Molecular Medicine Reports* 2020; **21**: 1421–1430.
- 81 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**. doi:10.3390/nu11061341.
- 82 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association* 2008; **20**.
- 83 Jha K, Shukla M, Pandey M. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surg Oncol*. 2012; **21**: 125–131.

- 84 Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research* 2015; **142**: 389–397.
- 85 Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y *et al.* Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- $\beta$ /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.

