

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS HITAM
TERHADAP EKSPRESI GEN SUPEROXIDE DISMUTASE
DAN JUMLAH MELANIN
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6J Model
Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

Yosi Hidayati

MBK 2220010339

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

2024

TESIS
PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS HITAM
TERHADAP EKSPRESI GEN SUPEROXIDE DISMUTASE
DAN JUMLAH MELANIN
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Mencit C57BL/6J Model
Hiperpigmentasi yang Terpapar UVB)

Disusun Oleh:

Yosi Hidayati

(MBK 2220010339)

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

Menyetujui,

Pembimbing I



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

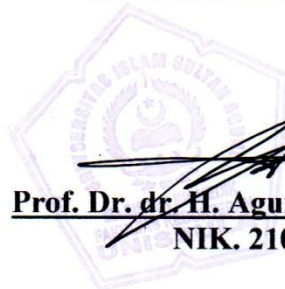
Pembimbing II

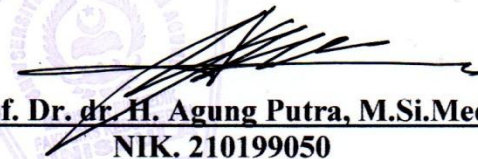


Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A
NIK. 210105097

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula




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

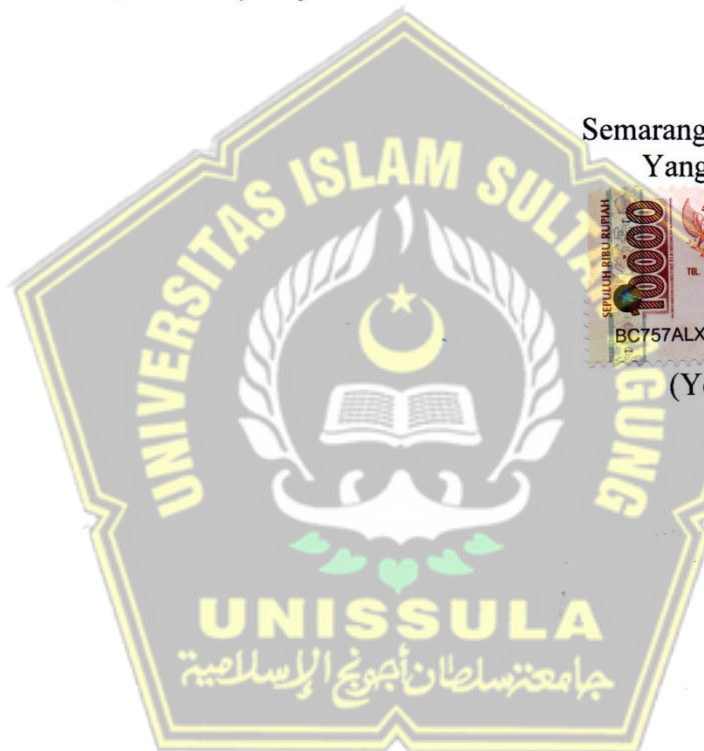
PERNYATAAN

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

Semarang, 27 Agustus 2024
Yang menyatakan,



(Yosi Hidayati)



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 PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS HITAM TERHADAP EKSPRESI GEN SOD DAN JUMLAH MELANIN (Studi Eksperimental in Vivo Pada Mencit 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. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE.Subsp.DKE.FINSDV.FAADV selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Prof, Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes selaku dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
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,

(Yosi Hidayati)



ABSTRAK

Latar Belakang: Radiasi ultraviolet B (UVB) dapat menginduksi hiperpigmentasi dan stres oksidatif pada kulit. Beras hitam (*Oryza sativa* L. indica) mengandung antioksidan yang mungkin dapat melindungi dari kerusakan akibat UVB. Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki efek krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen superoxide dismutase (SOD) dan jumlah melanin pada model mencit hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain post-test control group dilakukan menggunakan mencit C57BL/6J. Mencit dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok perlakuan menerima aplikasi topikal krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% selama 15 hari, sementara kelompok kontrol menerima basis krim. Semua kelompok, kecuali kontrol normal, dipapar radiasi UVB sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 15 cm untuk menginduksi hiperpigmentasi. Ekspresi gen SOD dianalisis menggunakan RT-PCR, dan jumlah melanin diukur menggunakan pewarnaan spesifik fontana masson staining.

Hasil: Kelompok yang diberi krim ekstrak beras hitam 2% ($1,39 \pm 0,14$) dan 4% ($1,46 \pm 0,11$) menunjukkan peningkatan ekspresi gen SOD yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol yang terpapar UVB ($0,70 \pm 0,21$).

Selain itu, jumlah melanin pada kelompok perlakuan krim ekstrak beras hitam 2% ($10,16 \pm 0,94$) dan 4% ($8,72 \pm 0,95$) lebih rendah daripada kelompok kontrol negatif yang terpapar UVB ($14,38 \pm 0,70$), menunjukkan potensi efek perlindungan terhadap hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

Kesimpulan: Aplikasi topikal krim ekstrak beras hitam meningkatkan ekspresi gen SOD dan mengurangi jumlah melanin pada kulit mencit yang terpapar UVB. Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam mungkin memiliki efek perlindungan terhadap stres oksidatif dan hiperpigmentasi yang diinduksi UVB, kemungkinan melalui sifat antioksidannya.

Kata Kunci: Ekstrak beras hitam, superoxide dismutase, melanin, radiasi UVB, hiperpigmentasi, antioksidan

ABSTRACT

Background: Ultraviolet B (UVB) radiation can induce hyperpigmentation and oxidative stress in the skin. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) contains antioxidants that may protect against UVB-induced damage. This study aimed to investigate the effects of black rice extract cream on superoxide dismutase (SOD) gene expression and melanin content in a UVB-induced hyperpigmentation mouse model.

Methods: An experimental study with a post-test control group design was conducted using C57BL/6J mice. Mice were divided into control and treatment groups. The treatment groups received topical application of 7.5% and 15% black rice extract cream for 14 days, while the control group received base cream. All groups, except the normal control, were exposed to UVB radiation at 302 nm and MED 390 mJ/cm² for about 15 minutes/day, 3 times a week, for 2 weeks with a lamp distance of 15 cm to induce hyperpigmentation. SOD gene expression was analyzed using RT-PCR, and melanin content was measured using specific Fontana-Masson staining.

Results: Groups treated with 2% (1.39 ± 0.14) and 4% (1.46 ± 0.11) black rice extract cream showed significantly higher SOD gene expression compared to the UVB-exposed control group (0.70 ± 0.21). Additionally, melanin content in the treatment groups with 2% (10.16 ± 0.94) and 4% (8.72 ± 0.95) black rice extract cream was lower than the negative control group exposed to UVB (14.38 ± 0.70), indicating a potential protective effect against UVB-induced hyperpigmentation.

Conclusion: Topical application of black rice extract cream increased SOD gene expression and reduced melanin content in UVB-exposed mouse skin. These findings suggest that black rice extract may have protective effects against UVB-induced oxidative stress and hyperpigmentation, possibly through its antioxidant properties.

Keywords: Black rice extract, superoxide dismutase, melanin, UVB radiation, hyperpigmentation, antioxidant

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)	10
2.1.1. Definisi <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD).....	10
2.1.2. Peran SOD Dalam Menghambat Hiperpigmentasi.....	10
2.1.3. Mekanisme Produksi SOD secara Molekuler.....	13
2.2. Melanin.....	15
2.2.1. Definisi Melanin.....	15

2.2.2. Peran Melanin terhadap Hiperpigmentasi	15
2.3. Ekstrak Beras Hitam.....	20
2.3.1. Definisi Ekstrak Beras Hitam.....	20
2.3.2. Peran Ekstrak Beras Hitam sebagai Antioksidan	21
2.4. <i>Hiperpigmentasi</i>	22
2.4.1. Definisi	22
2.4.2. Proses <i>Hiperpigmentasi</i>	22
2.5. Efek Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen SOD dan Jumlah Melanin.....	24
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	26
3.1. Kerangka Teori.....	26
3.2. Kerangka Konsep	29
3.3. Hipotesis.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	30
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	31
4.2.1. Variabel Penelitian	31
4.2.2. Definisi Operasional	31
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	33
4.3.1. Subjek Penelitian	33
4.3.2. Sampel Penelitian	33
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian	34
4.3.4. Besar Sampel	34
4.4. Alat dan Bahan	35
4.4.1. Alat	35
4.4.2. Bahan.....	36
4.5. Cara Penelitian	36
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	36
4.5.2. Pembuatan Krim ekstrak beras hitam.....	36
4.5.3. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB	36
4.5.4. Pembuatan Blok Parafin	37

4.5.5. Validasi dan Analisis Peningkatan Jumlah Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin.....	38
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan.....	38
4.5.7. Analisis Kuantitatif Ekspresi gen SOD menggunakan RT-PCR...	39
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	40
4.7. Analisa Data	40
4.8. Alur Penelitian.....	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1. Hasil Penelitian	44
5.1.1. Ekstraksi Beras Hitam dan Uji Kualitatif Skrining Fitokimia.....	44
5.1.2. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen SOD Pada Mencit Galur B6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB.....	46
5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Jumlah Melanin Pada Mencit Galur B6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB.....	50
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	53
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	58
5.1. Kesimpulan.....	58
5.2. Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN.....	68

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- γ	: <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-κB	: <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-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF-α	: <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 TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 5.1.	Uji skrining fitokimia ekstrak beras hitam	45
Tabel 5.2.	Uji analisis kuantitatif kandungan ekstrak beras hitam	45
Tabel 5.3.	Data hasil Penelitian Ekspresi Gen SOD dan Jumlah Melanin	47
Tabel 5.4.	Uji <i>post hoc Tamhane</i> ekspresi gen SOD pada masing-masing Kelompok.....	48
Tabel 5.5.	Uji <i>post hoc LSD</i> jumlah melanin pada masing-masing Kelompok	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Mekanisme keseimbangan redoks di kulit	11
Gambar 2.2.	Skema kaskade transduksi sinyal melanogenesis	17
Gambar 2.3.	Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB.....	24
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	28
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	29
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	30
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	42
Gambar 5.1.	Morfologi kulit hewan model diamati secara visual sebelum dan sesudah paparan UVB.	46
Gambar 5.2.	Grafik ekspresi gen SOD pada seluruh kelompok penelitian. Rata-rata \pm SD, * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.	48
Gambar 5.3.	(A) Gambaran mikroskopis pewarnaan melanin pada sampel kulit mencit dan (B) Grafik jumlah melanin pada Seluruh kelompok Penelitian. Rata-rata \pm SD, * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearens</i>	68
Lampiran 2. Uji Statistika	69
Lampiran 3. Hasil Skrining Fitokimia	74
Lampiran 4. Dokumetasi Penelitian	75



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi sinar ultraviolet B (UVB) yang diemisikan oleh matahari dapat memicu timbulnya berbagai masalah kulit seperti hiperpigmentasi¹. Paparan UVB menyebabkan fotolisis air, menghasilkan radikal hidroksil (OH·) dan superoksida (O₂⁻). Superoksida akibat paparan sinar UVB ini dapat menginduksi peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) sehingga mempercepat proses penuaan kulit, meningkatkan proliferasi melanosit, dan meningkatkan sintesis melanin². Produksi ROS yang berlebihan tidak diimbangi dengan homeostasis produksi enzim antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD) dapat menyebabkan overproduksi melanin³. ROS menghambat jalur *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 antioxidant responsive element* (Nrf2-ARE) sehingga menekan ekspresi SOD yang dapat menginduksi sintesis melanin pada kasus hiperpigmentasi^{4,5}. Ekstrak beras hitam mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang dapat menginduksi produksi enzim antioksidan sehingga dapat mencegah produksi melanin.^{6,7} Namun, hingga saat ini terkait dengan variasi dosis lotion beras hitam masih sedikit, sehingga pada penelitian ini akan dianalisis efek pemberian ekstrak beras hitam pada dosis 7,5% dan 15% terhadap ekspresi gen SOD dan jumlah melanin.

Peningkatan paparan sinar UVB akibat kerusakan lapisan ozon dalam beberapa tahun terakhir dan perubahan gaya hidup telah menjadi perhatian

penting karena dapat menginduksi *hiperpigmentasi* yang meningkatkan kasus penuaan kulit⁸⁻¹⁰. Pada tahun 2020, sekitar 6,2% dari 182 orang yang terpapar tiga kali UVB dengan minimal erythema dose (MED) 390mj/cm² mengalami hiperpigmentasi. Pada tahun 2022, jumlah kasus hiperpigmentasi meningkat secara signifikan menjadi sekitar 110.350 kasus baru¹¹. Sampai saat ini, penggunaan beberapa agen kimia seperti arbutin, asam azelaic, asam kojic, dan hidrokuinon telah menjadi pilihan utama dalam mencegah atau mengobati hiperpigmentasi kulit serta merangsang produksi kolagen. Namun, disebutkan bahwa agen-agen kimia tersebut dapat menyebabkan efek samping yang merugikan seperti genotoksisitas, iritasi kulit, dermatitis kontak, dan bahkan kanker kulit¹²⁻¹⁴. Penting untuk mencari agen alami yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi, salah satunya adalah ekstrak beras hitam.

Pemberian antioksidan terbukti dapat menurunkan kadar ROS sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada penekanan melanogenesis.¹⁵ Beras hitam mengandung berbagai senyawa metabolit seperti flavonoid, saponin, dan triterpenoids yang terbukti memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan.^{6,7} Ekstrak beras hitam dosis 0.4mg/mL menghambat aktivitas tyrosinase hingga 80,50% sehingga mencegah pembentukan melanin.^{16,17} Ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan mencegah ekspresi SOD.¹⁸ Ekstrak beras hitam dapat menghambat aktivasi jalur nuclear factor kappa beta (NF- κ B) sehingga

dapat menginduksi aktivasi jalur PI3K/Akt yang akhirnya menekan aktivasi *melanocyte inducing transcription factor* (MITF) pada sel melanoma.^{19,20}

Melanocyte Inducing Transcription Factor (MITF) adalah jalur utama produksi melanin sebagai respon terhadap paparan irradiasi UVB, adanya penghambatan aktivitas enzim tyrosinase yang menyebabkan terblokirnya aktivasi MITF oleh ekstrak beras hitam secara tidak langsung menekan produksi melanin.^{16,17} Mekanisme molekuler yang mendasari aktivitas ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen SOD dan jumlah melanin pada hiperpigmentasi kulit hingga saat ini masih belum jelas.

Bentuk sediaan krim dapat membantu bahan aktif untuk berpenetrasi ke dalam lapisan kulit dengan lebih efektif dan memiliki sifat emolien yang dapat melembabkan kulit. Krim juga memiliki konsistensi setengah padat yang cocok untuk aplikasi pada kulit. Sifat ini memungkinkan krim untuk mudah diaplikasikan dan menyebar dengan baik di permukaan kulit yang mengalami hiperpigmentasi. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen SOD dan jumlah melanin pada mencit galur C57BL/6J hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen SOD dan jumlah melanin pada mencit 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 SOD dan jumlah melanin pada mencit 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 SOD pada mencit 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 jumlah melanin pada mencit 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 SOD dan jumlah melanin pada mencit 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 ²¹	<i>Effect of Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats</i>	Eksperimental, <i>In vivo</i>	Induksi hiperpigmentasi pada mencit jantan galur C57BL/6J dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm ² sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan <i>spesifik staining</i> melanin pada hari ke 14.
2	Sun-nyoung hwang, Jaecheon kim, Mohammad Iqbal Hossain Bhuiyan, Joo youn kim, Ji seonyang, Shin hee yoon, Kee dong yoon, Seong yun kim ²²	Black Rice (<i>Oryza sativa</i> L., Poaceae) Extract Reduces Hippocampal Neuronal Cell Death Induced by Transient Global Cerebral Ischemia in Mice	Eksperimental, <i>In vivo</i>	Ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan dosis 300mg/kgBB/hari dengan menghambat peroksidasi lipid dan stress oksidatif pada mencit model cerebral iskemia.
3	Mahdi Jufri, Afifah Vardhani, Erni Purwaningsih ¹⁶	Evaluating the Efficacy of Lotion Containing Black Rice Bran (<i>Oryza sativa</i> L. indica) Extract as Skin Brightening Agent:	Eksperimental, <i>Clinical trial</i>	Lotion yang mengandung 10% ekstrak beras hitam ini efektif sebagai pencerah kulit karena efektif menurunkan produksi melanin pada kulit

A Clinical Trial				
4	Afifah vardhani, Mahdi jufri, Erni purwaningsih ²³	Potency Of Γ -Oryzanol-Rich Black Rice Bran (Oryza Sativa L. Indica) Extract For Tyrosinase Inhibition	Eksperimental, <i>In vivo</i>	Ekstrak beras hitam mengandung 118,572 mg/g γ -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 ²⁴	Black rice extract modulate ultraviolet-induced expression of matrix metalloproteinases and procollagen in a skin cell model	Eksperimental <i>Invitro</i>	Ekstrak beras hitam secara signifikan meningkatkan ekspresi prokolagen tipe I, dan menurunkan ekspresi MMP-1 dan MMP-3 pada sel HDF yang diiradiasi 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 mencit jantan galur B6J dengan UVB 302nm pada MED 390mJ/cm² sebanyak 3x seminggu selama 2 minggu. Validasi hiperpigmentasi dengan menggunakan *spesifik staining* melanin pada hari ke 14.²¹ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar

UVB dan di analisis ekspresi gen SOD dan jumlah melanin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan dosis 300mg/kgBB/hari dengan menghambat peroksidasi lipid dan stress oksidatif pada mencit model cerebral iskemia.²² Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen SOD dan jumlah melanin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa lotion yang mengandung 10% ekstrak beras hitam ini efektif sebagai pencerah kulit karena efektif menurunkan produksi melanin pada kulit.¹⁶ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen SOD dan jumlah melanin. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa Ekstrak beras hitam mengandung 118,572 mg/g γ -oryzanol, dan ekstraknya menghambat aktivitas tirosinase pada IC50 74,8%.²³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen SOD dan jumlah melanin. Penelitain 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 diiradiasi 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.²⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana krim ekstrak beras hitam akan ditreatment pada mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB dan di analisis ekspresi gen SOD dan jumlah melanin.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Superoxide Dismutase (SOD)*

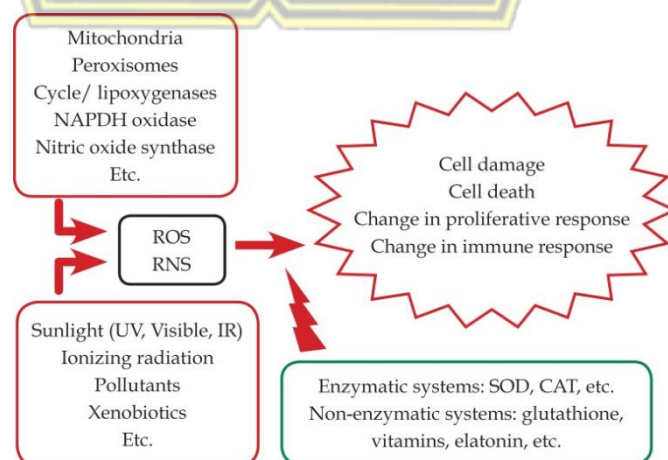
2.1.1. Definisi *Superoxide Dismutase (SOD)*

Superoxide Dismutase adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis dismutasi (atau partisi) superoksida (O_2^-) radikal menjadi molekul oksigen biasa (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Hidrogen peroksida juga merusak dan didegradasi oleh enzim lain seperti katalase. SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal²⁵.

2.1.2. Peran SOD Dalam Menghambat Hiperpigmentasi

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah radikal hidroksil ($HO\bullet$) dan superoksida ($O_2^{\bullet-}$), radikal peroksil dan alkoxyl ($RO_2\bullet$ dan $RO\bullet$), oksigen singlet (1O_2)³⁻⁵, serta hidrogen peroksida (H_2O_2) dan peroksida organik ($ROOH$). Selain kerusakan langsung pada molekul seperti lipid, asam amino dan DNA, ROS dapat mengaktifkan respons seluler enzimatik dan non-enzimatik, dengan potensi untuk memodifikasi proses lain yang akhirnya mengganggu dengan ekspresi gen²⁶.

Antioksidan adalah zat yang bergabung untuk menetralkan spesies oksigen reaktif yang mencegah kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan. Sistem antioksidan kulit terdiri dari zat enzimatik dan non-enzimatik. Di antara antioksidan enzimatik, glutathione peroksidase (GPx), katalase (CAT) dan superoksida dismutase (SOD)²⁷. Di antara beberapa mekanisme antioksidan, SOD memainkan peran sentral dalam berbagai molekul reaktif yang dinetralkan. Meskipun masih belum ada korelasi langsung, model hewan menunjukkan bahwa kurangnya SOD menyebabkan perubahan degeneratif dengan berkurangnya kolagen. Mungkin, vitamin C akan berdampak positif pada status pengurangan SOD yang mencegah atrofi karena degradasi kolagen²⁸. Sebuah klinis juga mempelajari sistem antioksidan endogen pada pasien dengan melasma menunjukkan konsumsi yang signifikan dari SOD dan glutathione peroksidase menyebabkan pecahnya keseimbangan redoks²⁹.



Gambar 2.1. Mekanisme keseimbangan redoks di kulit³⁰

Mekanisme *Superoxide Dismutase* (SOD) dalam menghambat hiperpigmentasi dapat melalui berbagai mekanisme seperti:

1. Peran *Superoxide Dismutase* (SOD) sebagai antioksidan, *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan enzim antioksidan endogen yang berperan penting dalam sistem pertahanan antioksidan tubuh. *Superoxide Dismutase* (SOD) berfungsi mengkatalisis dismutasi superoksida ($O_2^{\bullet-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2).
2. Mengurangi stres oksidatif, hiperpigmentasi sering dikaitkan dengan peningkatan stres oksidatif pada kulit. *Superoxide Dismutase* (SOD) membantu mengurangi stres oksidatif dengan menetralkan radikal bebas, khususnya anion superoksida, yang dapat memicu produksi melanin berlebih.
3. Menghambat aktivasi tirosinase, radikal bebas dapat mengaktifkan enzim tirosinase, yang merupakan enzim kunci dalam proses melanogenesis. Dengan menetralkan radikal bebas, *Superoxide Dismutase* (SOD) secara tidak langsung menghambat aktivasi tirosinase, sehingga mengurangi produksi melanin.
4. Melindungi sel melanosit, *Superoxide Dismutase* (SOD) melindungi sel melanosit dari kerusakan oksidatif yang dapat menyebabkan disfungsi sel dan produksi melanin berlebih.

5. Mengurangi inflamasi, stres oksidatif dapat memicu inflamasi kulit, yang dapat merangsang produksi melanin. *Superoxide Dismutase* (SOD) membantu mengurangi inflamasi dengan menetralkan radikal bebas, sehingga secara tidak langsung menghambat hiperpigmentasi.
6. Mempertahankan homeostasis kulit, *Superoxide Dismutase* (SOD) berperan dalam mempertahankan keseimbangan redoks kulit, yang penting untuk fungsi normal sel kulit termasuk melanosit.
7. Sinergisme dengan antioksidan lain, *Superoxide Dismutase* (SOD) bekerja sinergis dengan antioksidan lain seperti katalase dan glutathion peroksidase dalam sistem pertahanan antioksidan kulit, memberikan perlindungan komprehensif terhadap stres oksidatif yang dapat memicu hiperpigmentasi.³⁰

2.1.3. Mekanisme Produksi SOD secara Molekuler

Superoxide Dismutase (SOD) adalah enzim antioksidan yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Gen yang mengkode *Superoxide Dismutase* (SOD) terdapat dalam DNA sel dan diekspresikan melalui proses transkripsi dan translasi. Pada manusia, terdapat beberapa jenis *Superoxide Dismutase* (SOD) yang dikode oleh gen yang berbeda, seperti SOD1 (Cu/Zn-SOD) yang berada di sitoplasma, SOD2 (Mn-SOD) yang berada di mitokondria, dan

SOD3 (EC-SOD) yang berada di ruang ekstraseluler. Proses produksi *Superoxide Dismutase* (SOD) dimulai dengan transkripsi gen *Superoxide Dismutase* (SOD) menjadi mRNA di dalam inti sel. Faktor transkripsi yang mengikat promoter gen *Superoxide Dismutase* (SOD) mengatur tingkat ekspresi gen ini. Faktor-faktor seperti stres oksidatif dapat meningkatkan ekspresi gen *Superoxide Dismutase* (SOD) melalui aktivasi jalur sinyal tertentu. mRNA yang dihasilkan dari transkripsi kemudian ditranslasi menjadi protein *Superoxide Dismutase* (SOD) di ribosom. Proses ini melibatkan tRNA yang membawa asam amino yang sesuai dengan kodon pada mRNA. Proses translasi yang telah berakhir, protein *Superoxide Dismutase* (SOD) mengalami modifikasi pasca-translasi yang penting untuk aktivitas enzimatisnya. Misalnya, SOD1 memerlukan pengikatan ion tembaga dan seng untuk menjadi aktif, sedangkan SOD2 memerlukan pengikatan ion mangan. Protein SOD yang telah matang kemudian ditransportasikan ke lokasi spesifik di dalam sel. SOD1 berada di sitoplasma, SOD2 di mitokondria, dan SOD3 di ruang ekstraseluler. Lokalisasi ini penting karena radikal bebas dapat terbentuk di berbagai kompartemen seluler. *Superoxide Dismutase* (SOD) mengkatalisis dismutasi anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Reaksi ini penting untuk mengurangi stres oksidatif di dalam sel. Hidrogen peroksida yang dihasilkan kemudian diuraikan oleh enzim lain seperti katalase

atau glutathion peroksidase menjadi air dan oksigen.²⁶ Flavonoid dapat meningkatkan aktivitas SOD1 dengan merangsang ekspresi gen antioksidan endogen, termasuk SOD1, serta melindungi enzim ini dari kerusakan oksidatif.

2.2. Melanin

2.2.1. Definisi Melanin

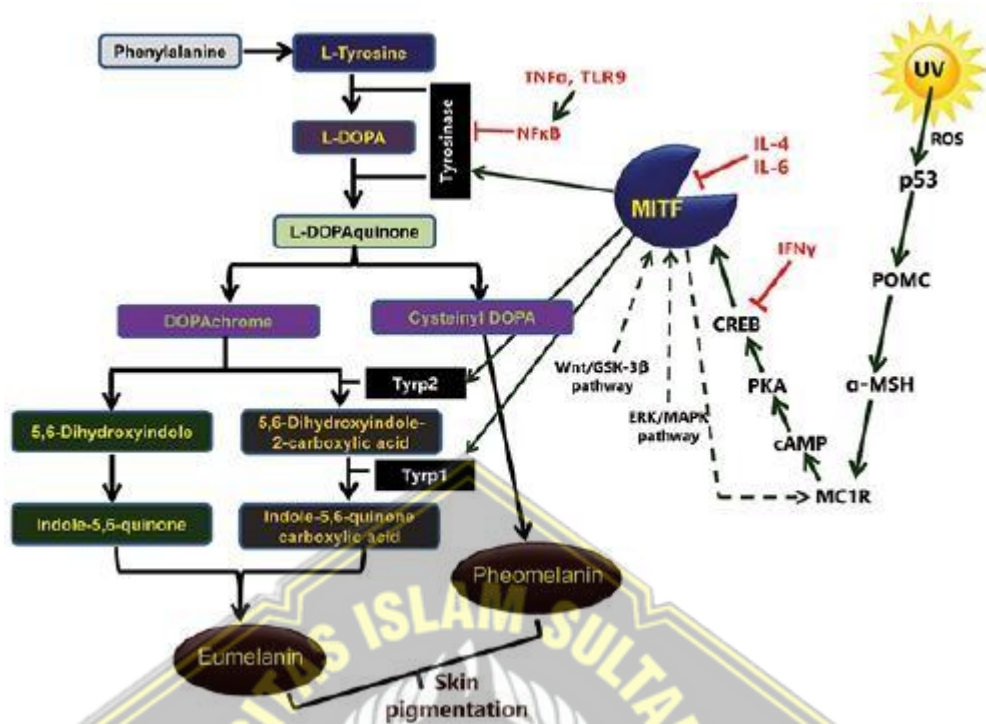
Melanin adalah pigmen pengatur warna kulit yang diproduksi melalui proses melanogenesis³¹. Melanogenesis adalah proses fisiologis yang menghasilkan sintesis biopolymer yang menghasilkan pigmen berwarna gelap³¹. Melanin disintesis oleh melanosom dan organel terkait lisosom dalam melanosit. Melanin berfungsi membantu melindungi kulit dari efek berbahaya sinar matahari dan bahan kimia³².

2.2.2. Peran Melanin terhadap Hiperpigmentasi

Terdapat dua jenis melanin yaitu eumelanin dan pheomelanin³³. Dalam jalur melanogenesis, terdapat tiga enzim utama yang terlibat yaitu tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1, yang biasa disebut gp75 glycoprotein atau gp75), dan tyrosinase-related protein 2 (TRP-2, yang biasa disebut dopachrome tautomerase atau Dct). Proses melanogenesis dimulai baik dengan hidroksilasi fenilalanin menjadi L-tirosin atau langsung oleh L-tirosin, yang kemudian dihidroksilasi menjadi L-

dihidroksifenilalanin (L-DOPA). L-DOPA selanjutnya dioksidasi menjadi L-DOPAquinone. Kedua reaksi ini dikatalisis oleh tyrosinase, yang oleh karena itu merupakan enzim kunci dalam melanogenesis³²⁻³⁴.

Jalur *downstream* melanogenesis melibatkan penambahan intramolekuler dari gugus amino ke TRP-2 sehingga menghasilkan DOPochrome. Setelah pembentukan L-DOPAquinone, jalur *downstream* melanogenesis dibagi menjadi 2 bagian yaitu yang mengarah ke sintesis “black-brownish eumelanin” dan “red- yellow pheomelanin”. Dalam jalur eumelanogenesis, DOPA chrome secara spontan diubah menjadi 5,6-dihidroksiindol atau secara enzimatis diubah menjadi asam 5,6- dihidroksiindol-2-karboksilat oleh TRP-2. Akhirnya, polimerisasi indol dan kuinon menghasilkan pembentukan eumelanin³⁵. Sintesis pheomelanin bergantung pada keberadaan sistein, yang bereaksi dengan L-DOPAquinone membentuk sisteinil- DOPA dan selanjutnya diubah menjadi kuinolin, kemudian, akhirnya, berpolimerisasi menjadi pheomelanin (Gambar 1). Meskipun melanin memainkan peran kunci dalam melindungi kulit dari radiasi ultraviolet (UVB) yang berbahaya, produksi dan akumulasi melanin yang tinggi secara tidak normal di kulit dapat menyebabkan gangguan hiperpigmentasi^{33,34}.



Gambar 2.2. Skema kaskade transduksi sinyal melanogenesis³³

Melanogenesis diatur melalui serangkaian multistep kaskade transduksi sinyal yang terkait dengan enzim tyrosinase, TRP-1 dan TRP-2 (Gambar 1)³³. Mekanisme utama regulasi melanin melalui paparan radiasi ultraviolet yang menginduksi melanogenesis melalui p53³³. Tumor suppressor protein p53 yang diinduksi radiasi UVB secara kritis mengatur ekspresi dan aktivitas tyrosinase dan TRP-1^{33,36}. Promotor proopiomelanokortin (POMC) berisi urutan konsensus p53, dimana p53 mengikat dan mengatur ekspresi gen ini³³. Aktivasi p53 yang diinduksi paparan UVB menghasilkan peningkatan ekspresi POMC, yang kemudian dibelah menjadi peptida kecil, seperti ACTH, α -, β -, dan γ -MSH³³. α -MSH yang diturunkan POMC menstimulasi reseptor melanokortin-1 (MC1R)

pada melanosit, menghasilkan peningkatan produksi eumelanin. Selain itu, radiasi UVB meningkatkan produksi reactive oxygen species (ROS) di keratinosit dan melanosit, dan pada konsentrasi tinggi ROS menyebabkan kerusakan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut sehingga memicu melanogenesis^{33,37}.

Mekanisme kedua yaitu regulasi intrinsik melanogenesis melalui *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF)³³. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor* (MITF) adalah faktor transkripsi, yang berisi struktur dasar *helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-LZ) dan bertindak sebagai pengatur utama perkembangan melanosit, kelangsungan hidup, dan fungsinya. MITF mengatur enzim utama melanogenik seperti tirosinase, TRP-1 dan TRP-2^{37,38}. Beberapa jalur pensinyalan yang terlibat dalam regulasi MITF sebagai berikut:

1. *cAMP-dependent signalling pathway*. Setelah reseptor MC1R pada melanosit distimulasi oleh α -MSH dan memicu produksi cAMP melalui aktivasi adenyl cyclase. cAMP selanjutnya mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang memfosforilasi protein pengikat elemen respons cAMP (CREB) dan mengarahkan pada regulasi MITF³⁹. MITF mengatur transkripsi gen pigmen yang mengkode melanogenesis-related protein (MRP) melalui interaksi dengan M- dan E- box yang ada di wilayah promotor tirosinase, TRP-1 dan TRP-2⁴⁰.

2. ERK / MAPK signalling pathway.

Penghambatan mitogen-activated protein kinase (MAPK) akan menghambat pergantian MITF dengan keberadaan sikloheksimida, sehingga melibatkan extracellular signal-regulated kinase (ERK) / MAPK dalam degradasi MITF⁴¹. Dalam jalur ini, interaksi reseptor ligan mengaktifkan protein Ras, yang selanjutnya mengaktifkan B-Raf kinase dan akibatnya ERK1/2. MAPK memfosforilasi protein MITF yang mengarah ke ubiquitination dan degradasi MITF yang mengakibatkan penurunan ekspresi gen yang berhubungan dengan melanogenesis⁴².

3. Melanogenesis yang dimodulasi akibat sistem kekebalan.

Melanosit adalah faktor aktif dalam sistem kekebalan kulit, memainkan peran penting dalam respons imun, dan memiliki sifat imunomodulator. Di sisi lain, mediator imun, seperti sitokin, secara langsung atau tidak langsung mengatur proliferasi, diferensiasi melanosit, dan melanogenesis. Misalnya, IL-4 menghambat melanogenesis dan menurunkan ekspresi gen terkait melanogenesis melalui aktivasi jalur JAK2-STAT6. IL-6 menekan melanogenesis dengan mengurangi ekspresi tirosinase dan transkrip MITF. TNF- α menghambat melanogenesis terutama melalui nuclear factor kappa B (NF- κ B) dan mengurangi waktu paruh tirosinase. Interferon-gamma (IFN- γ)

juga terlibat dalam patogenesis vitiligo, di mana IFN- γ diketahui menginduksi apoptosis pada melanosit. Hal ini menghambat melanogenesis dengan mengubah ekspresi enzim melanogenik dan menghambat pengikatan CREB ke promotor MITF melalui STAT1. Selain itu, IFN- γ mempertahankan homeostasis pigmentasi kulit dan memediasi hipopigmentasi melalui IRF1, yang selanjutnya mengontrol pematangan melanosom dalam melanosit. Toll-like receptors (TLRs), yang mengenali pola molekuler terkait patogen (PAMP) yang ada dalam mikroba, secara negatif juga mengatur melanogenesis. Melanosit manusia secara konstitutif mengekspresikan mRNA dan protein untuk TLR 2, 3, 4, 5, 7, 9 dan 10, dan TLR ini memainkan peran penting dalam modulasi melanogenesis. Namun, mekanisme pasti yang digunakan TLR untuk mengontrol melanogenesis tidak dipahami dengan jelas. Sebuah studi terbaru menunjukkan bahwa TLR9 mengatur melanogenesis melalui aktivasi NF- κ B⁴³.

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 H₂O₂. 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.^{18,19,22,23}

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.^{16,19}

2.4. *Hiperpigmentasi*

2.4.1. Definisi

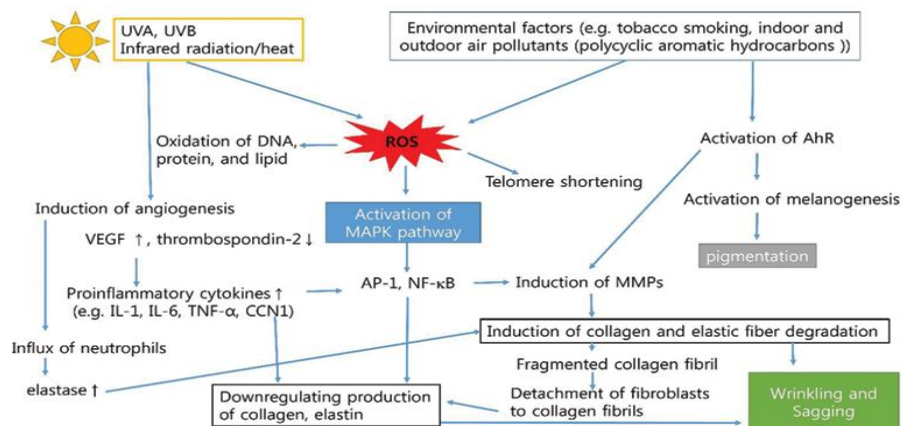
Hiperpigmentasi adalah penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. *Photoaging* berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan⁴⁴.

2.4.2. Proses *Hiperpigmentasi*

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UVB dan UVB sangat berperan dalam terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*⁴⁵. 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 bermakna⁴⁶. 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- β) dan activator protein (AP-1). TGF- β 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- β . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit⁴⁷⁻⁵⁰ Skema patofisiologi penuaan kulit baik ekstrinsik dapat diringkas pada gambar 2.6. berikut ini.



Gambar 2.3. Skema degradasi kolagen akibat paparan sinar UVB

2.5. Efek Ekstrak Beras Hitam Terhadap Ekspresi Gen SOD dan Jumlah Melanin

Senyawa metabolit sekunder ekstrak beras hitam memiliki aktivitas antioksidan dengan menekan kadar ROS.^{6,7} Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak beras hitam menekan aktivitas melanin melalui penurunan aktivitas tyrosinase intraseluler. Proses melanogenesis yang terhambat akibat inhibisi microphthalmia-associated transcription factor melalui jalur ERK, p38, dan fosforilasi Akt.⁵¹ Enzim SOD diketahui memiliki kemampuan dalam mendegradasi ROS menjadi senyawa non radikal bagi tubuh sehingga tidak menyebabkan induksi inflamasi dan kerusakan oksidatif yang memicu sintesis melanin⁵². Penggunaan senyawa antioksidan dapat mencegah aktivasi jalur MITF yang menyebabkan tyrosinase tidak aktif dan berdampak pada pencegahan produksi melanin berlebihan.⁵³

Beberapa penelitian ilmiah telah menunjukkan potensi senyawa antioksidan dalam menghambat produksi melanin melalui aktivitas

antioksidan dan menghambat enzim tyrosinase⁵⁴. 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 UVB⁵⁴. Paparan sinar matahari yang berlebihan dapat merusak DNA kulit, yang dapat menyebabkan munculnya hiperpigmentasi. Dalam hal ini, potensi antioksidan ekstrak beras hitam dapat memberikan perlindungan tambahan melalui penangkapan radikal bebas, sehingga mengurangi risiko hiperpigmentasi yang disebabkan oleh sinar UV.^{7,17,51,55}

Meskipun terdapat beberapa bukti tentang potensi antioksidan ekstrak beras hitam untuk mengurangi hiperpigmentasi melalui aktivitas antioksidan, 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

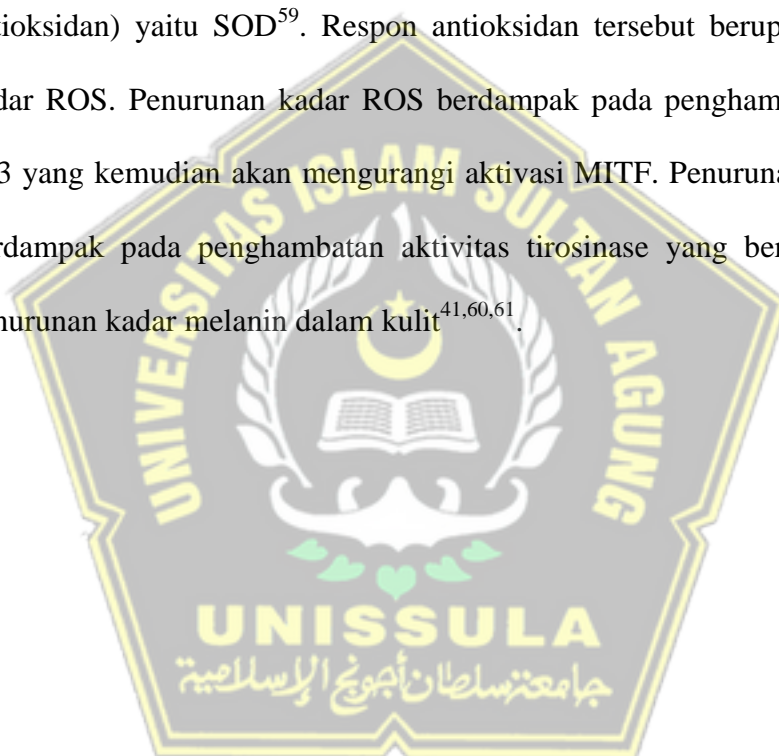
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

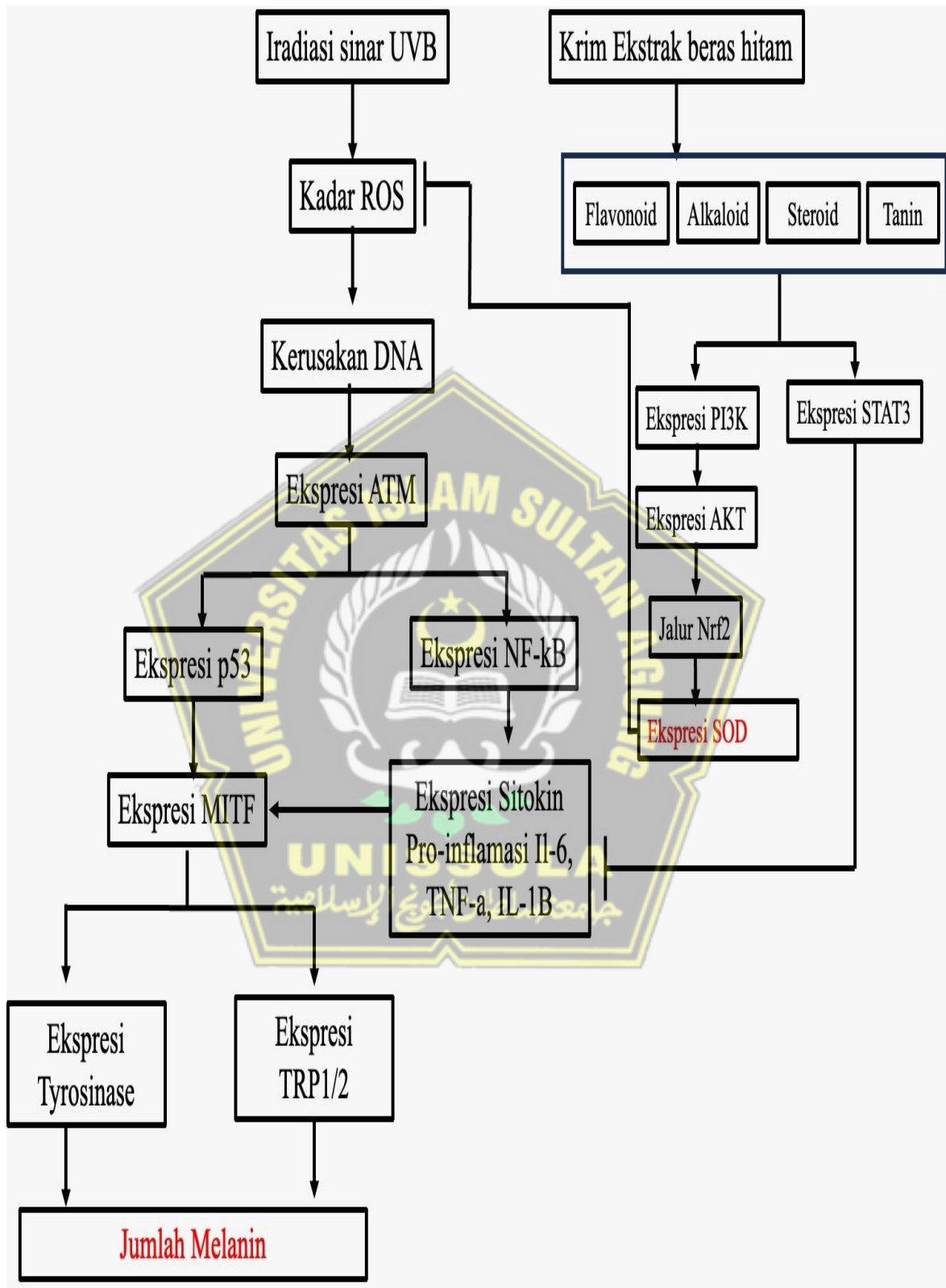
3.1. Kerangka Teori

Paparan terhadap radiasi UVB akut atau kronis dapat menginduksi penuaan kulit dini (hiperpigmentasi), menyebabkan perubahan kolagen dermal, hiperpigmentasi, peradangan kulit dan kanker kulit^{56,57}. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang diinduksi UVB termasuk kerusakan DNA dan produksi ROS sehingga menginduksi jalur ATM yang dapat mengaktifkan NF- κ B dan p53. Jalur pensinyalan seperti p38 MAPK dan Akt peran penting dalam respons terhadap ROS pathway yang diinduksi UVB, yang mengarah ke proses melanogenesis melalui jalur P53⁵⁶. Protein P53 menginduksi respon sinyal faktor transkripsi MITF yang berujung pada ekspresi tirosinase dan TRP-1. Ekspresi kedua molekul tersebut memicu akumulasi jumlah melanin pada kulit⁵⁸. Translokasi NF- κ B akibat stress oksidatif dapat menginduksi transkripsi faktor-faktor inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α yang dapat menginduksi produksi melanin, sehingga terjadi hiperpigmentasi.

Sifat antioksidan ekstrak beras hitam menghambat produksi ROS yang diinduksi UVB dan melindungi sel kulit dari stres oksidatif. Ekstrak beras hitam diketahui memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflamasi dengan menginduksi ekspresi MAPK dan *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K). PI3K yang teraktivasi akan menginduksi ekspresi AKT dan mengaktifkan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2).^{23,24} Aktivasi Nrf2 akan

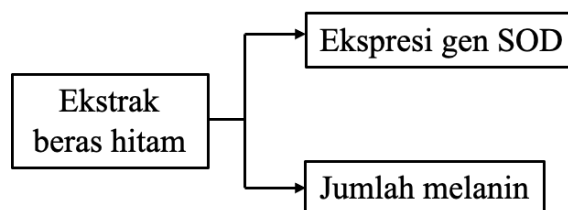
bertranslokasi ke nucleus sehingga dapat menginduksi pelepasan enzim-enzim antioksidan dan menekan produksi ROS. Senyawa ekstrak beras hitam juga dapat mengaktifasi STAT3 sehingga dapat menghambat inflamasi. Kompleks Nrf2 yang terikat bersama di dalam sitoplasma, ketika teraktivasi maka akan melepaskan diri melalui ubiquitinasi dan mentranslokasi ke dalam nukleus; kemudian Nrf2 mengaktifkan gen antioksidan (transkripsi gen antioksidan) yaitu SOD⁵⁹. Respon antioksidan tersebut berupa mengurangi kadar ROS. Penurunan kadar ROS berdampak pada penghambatan aktivasi P53 yang kemudian akan mengurangi aktivasi MITF. Penurunan MITF akan berdampak pada penghambatan aktivitas tirosinase yang berdampak pada penurunan kadar melanin dalam kulit^{41,60,61}.





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 superoxide dismutase dan jumlah melanin pada mencit jantan galur *C57BL/6J* model hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

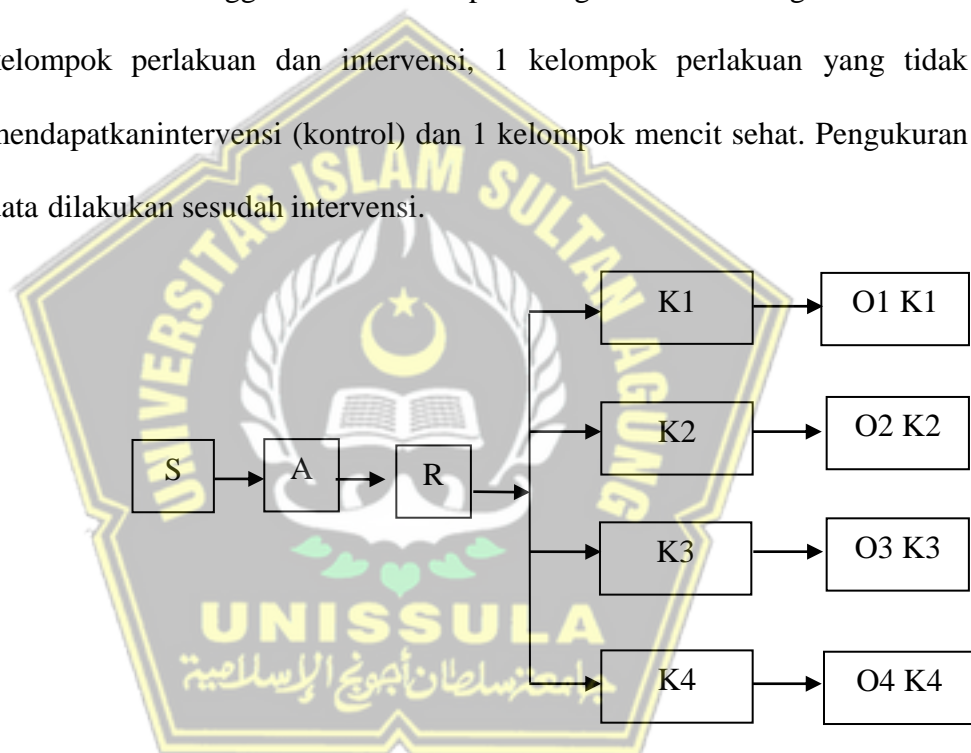


BAB IV

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 mencit sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel Penelitian (Mencit) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1 : Mencit Sehat

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

- Perlakuan : K3: Mencit model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian krim ekstrak beras hitam dosis 7,5%.
- Perlakuan : K4: Mencit model hiperpigmentasi jaringan dengan induksi sinar UVB dengan pemberian krim 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 SOD dan jumlah melanin

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 krim dengan dosis 7,5% dan 10%.

Satuan: gram

Skala: rasio

4.2.2.2. Ekspresi gen Superoxide Dismutase

Ekspresi gen Superoxide Dismutase adalah ekspresi gen yang memiliki peran dalam mencegah pembentukan melanin sebagai penyeimbang akibat tingginya kadar ROS iradiasi UVB. Ekspresi SOD diperoleh dari sampel jaringan kulit di area penyinaran, diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang dinyatakan dalam satuan rasio terhadap *housekeeping* gen GAPDH.

Satuan: Rasio mRNA level SOD /GAPDH

Skala: rasio

4.2.2.3. Jumlah melanin

Jumlah melanin adalah jumlah fraksi area melanin yang diekspresikan oleh jaringan kulit pada sampel penelitian. Jumlah melanin dianalisis menggunakan metode spesifik staining Masson Fontana. Hasil positif melanin jika terdapat warna kehitaman pada sampel slide jaringan dengan pewarna Masson Fontana. Jumlah melanin di sajikan dalam bentuk persentase fraksi area/seluruh luas area yang diperoleh dengan analisis menggunakan software ImageJ.

Satuan : persen fraksi area (%)

Skala: rasio

4.2.2.4. Hewan coba hiperpigmentasi

Hewan model hiperpigmentasi adalah hewan model yang mengalami hiperpigmentasi akibat induksi sinar UVB dengan panjang gelombang sebesar 302 nm dan MED 390 mJ/cm² yang dipapar sekitar 15 menit/hari selama 3 kali seminggu, hingga 2 minggu dengan jarak lampu 15 cm. Hewan model hiperpigmentasi dilakukan validasi pembentukan melanin pada hari ke-15 dengan pewarnaan Masson Fontana.

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah mencit 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/cm² 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. Mencit belum pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Mencit putih jantan galur C57BL/6J dengan kriteria:

1. Mencit sakit selama penelitian yang terlihat dengan aktivitas mencit melemah

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Mencit mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Mencit putih jantan galur C57BL/6J dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Sehat (mencit sehat tanpa penuaan dini akibat paparan UVB), Kontrol negatif (mencit model yang dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan), Perlakuan 1 (mencit model dipapar UVB dan diberi krim ekstrak beras hitam secara topikal dosis 7,5%) dan Perlakuan 2 (mencit model dipapar UVB dan diberi krim 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 mencit 6 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 6 ekor mencit 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/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum mencit 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, water base krim, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan mencit, dan chloroform.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Pembuatan Krim ekstrak beras hitam

Ekstrak beras hitam ditimbang 1,5 gram dan dicampur secara homogen dengan basis krim sebanyak 10 gram. Pembuatan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik pengamatan dibawah mikroskop.

4.5.3. Model Hiperpigmentasi dengan Paparan UVB

1. Mencit yang sudah diadaptasi selama lima hari dibius dengan dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal mencit potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm
3. Punggung mencit dipapar dengan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 390 mJ/cm²/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. Mencit Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan krim ekstrak beras hitam dengan dosis 7,5% dan 15% sebanyak 100mg tiap mencit yang diberikan satu kali sehari selama 15 hari selama penyinaran UV-B.

4.5.4. Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alcohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.5. Validasi dan Analisis Peningkatan Jumlah 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.²¹

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh mencit 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 gen SOD menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁶² Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).
2. Penentuan ekspresi gen SOD di amplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.

3. Perhitungan ekspresi gen Ekspresi gen SOD 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

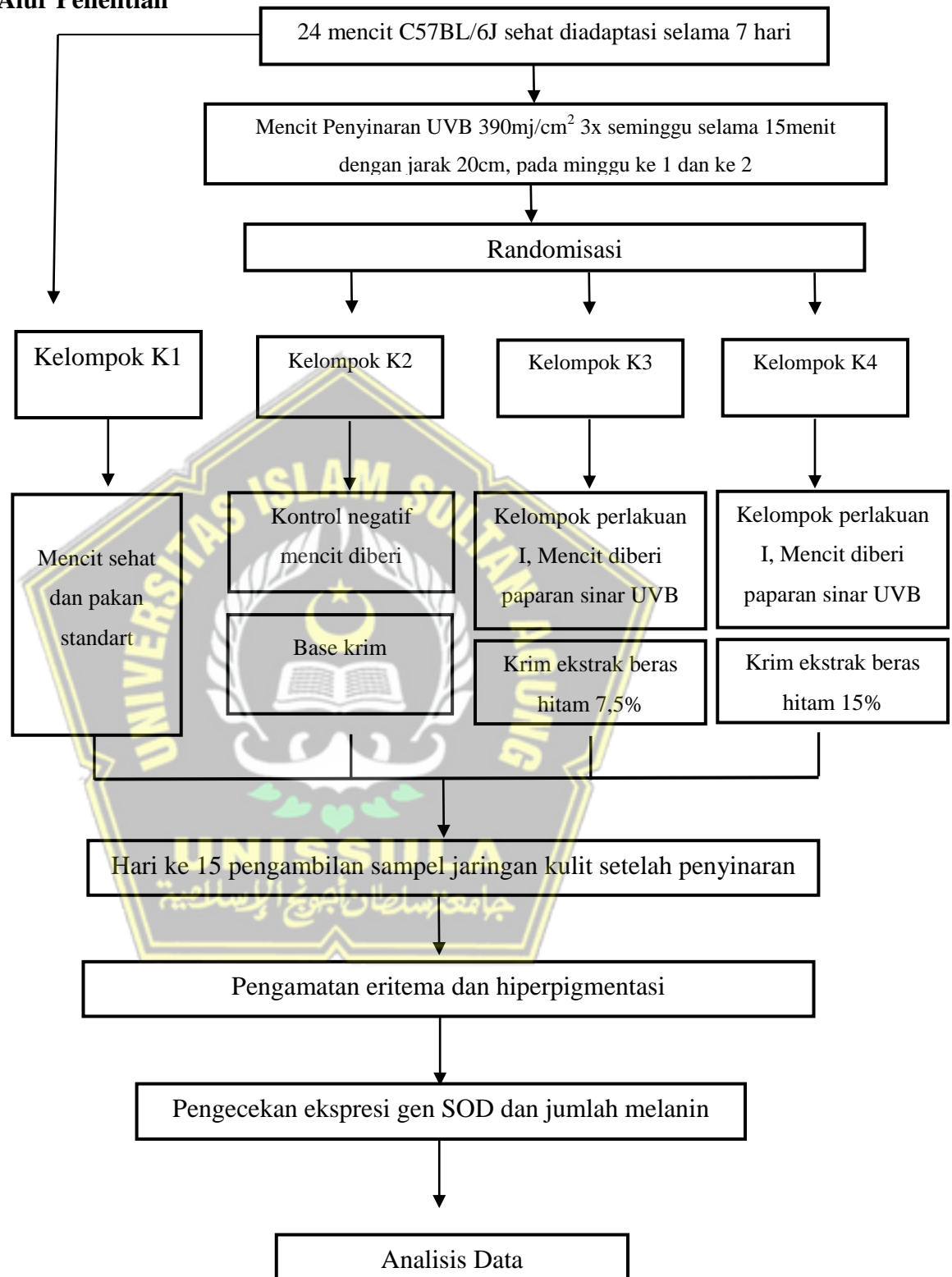
Penelitian dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian dilakukan pada April – Juni 2024.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Pada penelitian ini 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 mengkaji pengaruh krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi gen superoxide dismutase dan jumlah melanin pada kulit mencit hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB. Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yang dilakukan dari bulan Juni 2024 hingga Agustus 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia. Subjek penelitian ini adalah mencit jantan galur B6J dengan berat 200 – 250 gram dan berumur 2 – 2,5 bulan yang diberi paparan UVB light 302 nm dengan intensitas energi 390 mJ/cm^2 selama 15 menit 3x seminggu selama 2 minggu dan dilanjutkan dengan pemberian krim ekstrak ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% selama 15 hari berturut-turut sebelum paparan sinar UVB. Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur B6J yang merupakan salah satu hewan coba yang paling sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena memiliki struktur kulit mirip kulit manusia. Penggunaan hewan model jantan bertujuan untuk mencegah faktor perancu hormonal yang dapat mempengaruhi pelepasan enzim antioksidan seperti SOD dan proses produksi melanin. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 24 ekor mencit jantan galur B6J dan tidak ada *drop out* selama penelitian selama berlangsung. Penelitian terdiri dari 4 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok sehat, 1 kelompok mencit kontrol negatif, 2 kelompok perlakuan. Kelompok mencit sehat merupakan mencit sehat tanpa perlakuan dan tanpa intervensi. Kelompok kontrol negatif mendapatkan krim basis 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 15 hari berturut-turut. Pemberian krim ekstrak beras hitam dilakukan secara topikal di area kulit yang dipapar UVB secara merata.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Ekstraksi Beras Hitam dan Uji Kualitatif Skrining Fitokimia

Ekstrak beras hitam pada penelitian ini diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol, menghasilkan rendemen sebesar 8,70%. Ekstrak tersebut memiliki karakteristik kental, beraroma batang, dan berwarna coklat kehitaman. Selanjutnya, dilakukan analisis skrining fitokimia kualitatif pada ekstrak kental tersebut. Hasil skrining menggunakan reagen spesifik menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan tanin. Penelitian ini juga menentukan total flavonoid dalam ekstrak menggunakan metode spektrofotometri. Pada konsentrasi 1000 ppm, ekstrak mengandung flavonoid sebesar $90,30 \pm 4,02$ mg/100g. Ekstrak beras hitam ini juga mengandung total fenolik $14,64 \pm 0,40$ mg/100g yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar $67,98 \pm 8,16$ ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak beras hitam mengandung flavonoid dengan kadar 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 ₃ 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 (IC ₅₀)	67,98±8,16 ppm

Pada penelitian ini hewan model hiperpigmentasi yang di papir irradiasi UVB 390 mJ/cm² terlihat perbedaan visual warna kulit mencit 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 SOD Pada Mencit Galur B6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen SOD pada kulit mencit dengan metode qRT-PCR pada hari ke-15 penelitian. Ekspresi gen SOD dianalisis pada ke 24 hewan model mencit 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 SOD dan Jumlah Melanin

Variabel	Kelompok				pvalue
	Kontrol sehat=6 Mean±SD	Kontrol negatif n=6 Mean±SD	Krim Ekstrak Beras Hitam 7,5% n=6 Mean±SD	Krim Ekstrak Beras Hitam 15% n=6 Mean±SD	
Ekspresi gen SOD	1,03±0,02	0,70±0,21	1,39±0,14	1,46±0,11	
<i>Saphiro wilk</i>	0,122*	0,139*	0,769*	0,231*	
<i>Levene test</i>				0,001	
<i>One way ANOVA</i>				0,003***	
Jumlah Melanin	5,98±0,26	14,38±0,70	10,16±0,94	8,72±0,95	
<i>Shapiro wilk</i>	0,717*	0,366*	0,188*	0,846*	
<i>Levene test</i>				0,328**	
<i>One way ANOVA</i>				0,001***	

Keterangan :

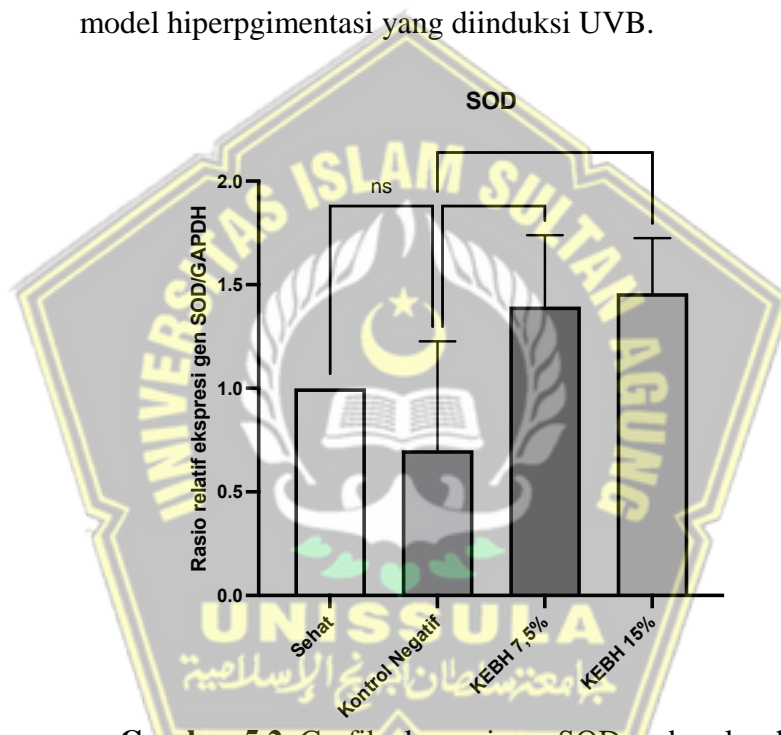
*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

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

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

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.3. Rerata ekspresi gen SOD di kelompok krim ekstrak beras hitam (KEBH) dosis 15% yang tertinggi pada kelompok perlakuan yaitu $1,46 \pm 0,11$, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen SOD di kelompok KEBH 7,5% ($1,39 \pm 0,14$). Ekspresi gen SOD pada kelompok sehat ($1,03 \pm 0,02$) dan kelompok kontrol negatif ($0,70 \pm 0,21$) memiliki nilai lebih rendah dari kelompok sehat yang membuktikan bahwa paparan sinar UVB menurunkan ekspresi gen SOD. Data ekspresi gen SOD pada semua kelompok penelitian terdistribusi normal yang ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$. Data penelitian ekspresi gen SOD 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 SOD adalah normal dan tidak homogen, maka

dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p=0,003$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen SOD yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.1). Berdasarkan hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa pemberian KEBH dapat menurunkan ekspresi gen SOD secara efektif pada dosis 15% pada mencit B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.



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

Tabel 5.4. Uji *post hoc Tamhane* ekspresi gen SOD pada masing-masing Kelompok

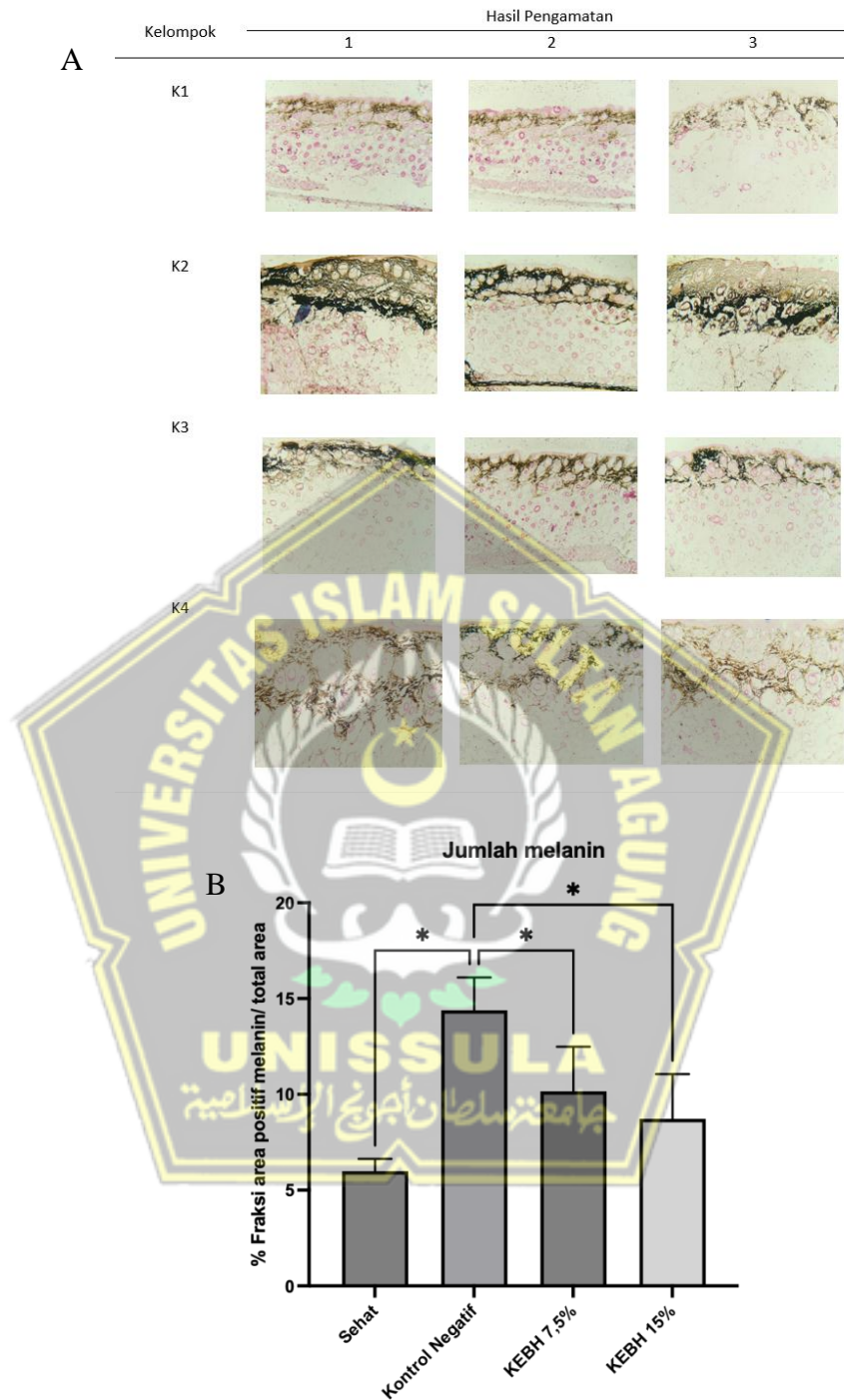
Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,695
	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,270
	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,063
Kontrol negatif	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,042*
	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,036*
Krim ekstrak beras hitam 7,5%	Krim ekstrak beras hitam 15%	1,000

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data di atas didapatkan perbandingan rerata kontrol sehat dengan kontrol negatif memiliki nilai signifikan $p=0,695$ ($p>0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok kontrol negatif menunjukkan kecenderungan penurunan ekspresi SOD. Namun, hasil ini tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Hal ini disebabkan oleh adanya tumpang tindih nilai ekspresi antara kedua kelompok, yang ditandai dengan rentang kesalahan (error bar) yang besar, sehingga menghasilkan perbedaan yang tidak signifikan secara statistik. Perbandingan kelompok kontrol negatif terhadap krim ekstrak beras hitam 7,5% memiliki nilai signifikan $p=0,042$ ($p>0,05$) dan terhadap krim ekstrak beras hitam (0,042) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak beras hitam 7,5% terhadap krim ekstrak beras hitam 15% memiliki nilai $p=1,000$ ($p>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. Secara keseluruhan pemberian krim ekstrak beras hitam dapat meningkatkan ekspresi gen SOD secara efektif dosis 15% pada mencit B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

5.1.3. Efek Pemberian Krim Ekstrak Beras Hitam Terhadap Jumlah Melanin Pada Mencit Galur B6J Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar UVB

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel 5.2. Rerata jumlah melanin di kelompok sehat yang terendah ($5,98 \pm 0,26$). Pada kelompok kontrol negatif terjadi peningkatan jumlah melanin tertinggi hingga $14,38 \pm 0,70$. Pemberian krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% memiliki trend yang berbeda yaitu menurunkan jumlah melanin. Pada krim ekstrak beras hitam 7,5% mengalami penurunan jumlah melanin menjadi $10,16 \pm 0,94$ dan pada kelompok krim ekstrak beras hitam 15% menurunkan jumlah melanin hingga $8,72 \pm 0,95$. Hasil uji normalitas dengan *Shapiro-wilk* diperoleh data pada semua kelompok penelitian terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Data penelitian jumlah melanin memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,328$ ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data jumlah melanin adalah terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata jumlah melanin yang signifikan di antara keempat kelompok (Gambar 5.2). Hasil uji *one way ANOVA* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.3. (A) Gambaran mikroskopis pewarnaan melanin pada sampel kulit mencit dan (B) Grafik jumlah melanin pada Seluruh kelompok Penelitian. Rata-rata \pm SD, * ($p < 0,05$): berbeda signifikan.

Tabel 5.5. Uji *post hoc* LSD jumlah melanin pada masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig
Kontrol sehat	Kontrol negatif	0,001*
	Krim ekstrak beras hitam 7,5%	0,001*
Kontrol negatif	Krim ekstrak beras hitam 15%	0,021*
	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%	0,201

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 beras hitam 7,5% memiliki nilai signifikan $p=0,001$ ($p<0,05$) dan terhadap kelompok krim ekstrak beras hitam 15% juga memiliki nilai $p<0,05$ (0,001), hal ini menunjukkan antara kelompok tersebut terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% memiliki nilai $p=0,201$ ($p>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan. Secara keseluruhan pemberian krim ekstrak beras hitam 15% dapat menurunkan jumlah melanin secara signifikan jika di bandingkan dengan kelompok kontrol negatif pada mencit B6J model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Sinar UVB menyebabkan kerusakan oksidatif DNA akibat peningkatan radikal bebas (ROS) yang ditandai dengan penurunan berbagai enzim antioksidan⁶³. Peningkatan kadar ROS menginduksi ekspresi sirtuins 1 (Sirt1) yang akan mengaktifkan protein *PPAR γ coactivator 1 α* (PGC-1a). Aktifasi PGC-1a menginduksi ubiquitinasi *kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), jika Keap1 terikat dengan Nrf2 maka akan mengaktifkan ekspresi enzim antioksidan SOD.⁶⁴ SOD1 telah terbukti memiliki efek penghambatan pada melanogenesis yang diinduksi oleh UVB, yaitu proses produksi melanin di kulit.⁶⁵ Dalam sebuah studi yang melibatkan mencit hairless HRM-2 yang memiliki melanin, teramati bahwa paparan UVB meningkatkan kandungan melanin, yang mengarah pada hiperpigmentasi.⁶⁶ Pemberian suatu senyawa antioksidan terbukti meningkatkan SOD1 secara signifikan sehingga menghambat peningkatan produksi melanin, menunjukkan bahwa SOD1 dapat melawan hiperpigmentasi yang diinduksi oleh UVB dengan mengurangi kandungan melanin.^{21,66} Hasil penelitian tersebut linier dengan penelitian ini, dimana krim ekstrak beras hitam yang terbukti mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, steroid, dan tannin secara signifikan meningkatkan ekspresi gen SOD pada dosis 7,5% dan 15%, serta menurunkan jumlah melanin secara signifikan pada dosis 7,5% dan 15%. Peningkatan aktivitas lebih optimal pada dosis yang lebih besar yaitu dosis 15%.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah mengkonfirmasi bahwa ekstrak yang mengandung flavonoid mampu menurunkan dan menjaga keseimbangan kadar ROS dengan cara meningkatkan pembentukan antioksidan.^{67,68} Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler diantaranya pengaturan diferensiasi, proliferasi, migrasi, kelangsungan hidup, dan apoptosis⁶⁹. SOD atau adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis dismutasi superoksida (O_2^-) radikal menjadi molekul oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal^{25,70}. Telah dilaporkan bahwa *superoxidative dismutase* (SOD) adalah salah satu faktor kunci yang mengurangi produksi melanin yang disebabkan oleh iradiasi UV. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa iradiasi UVB mampu menekan SOD1 secara signifikan, sedangkan diinduksi oleh paparan UVB yang terus menerus dapat mengakibatkan stres fotooksidatif kronis^{71,72}. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa peningkatan SOD dapat menekan proses melanogenesis melalui jalur Tyrosinase⁷¹. Pemberian senyawa antioksidan dapat menurunkan stress oksidatif sehingga menunjukkan efek protektif yang baik pada kulit. Penurunan stres oksidatif akibat paparan sinar UVB akut dapat dicegah dengan berbagai senyawa yang mampu menyeimbangkan radikal seperti senyawa flavonoid, alkaloid,

dan tanin⁷³. Pada penelitian ini senyawa antioksidan tersebut terbukti positif pada ekstrak beras hitam, dengan konsentrasi flavonoid total 497,95 mg/100g. Adanya kandungan senyawa flavonoid tersebut terbukti dapat meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan jumlah melanin pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang terpapar sinar UVB.

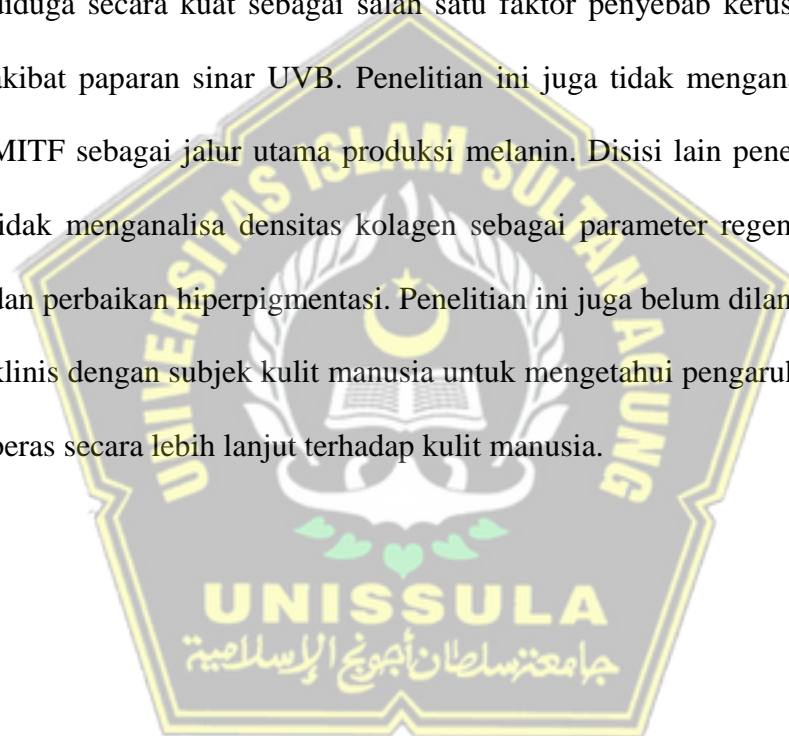
Pada penelitian ini pemberian krim ekstrak beras hitam secara signifikan meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan jumlah melanin secara signifikan pada kedua dosis yaitu dosis 7,5% dan 15%. Pemberian krim ekstrak beras hitam 7,5% dan 15% meningkatkan ekspresi gen SOD sebesar rasio 1,39 dan 1,46 pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang induksi sinar UVB. Peningkatan ekspresi gen SOD ini sejalan dengan penurunan jumlah melanin, dimana pada krim ekstrak beras hitam dosis 15% terefektif meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan jumlah melanin. Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi efektif krim ekstrak beras hitam dalam meningkatkan ekspresi gen SOD dan menurunkan jumlah melanin pada kulit mencit hiperpigmentasi yang diinduksi sinar UVB adalah pada konsentrasi 15%. Penelitian sebelumnya telah mengkonfirmasi bahwa senyawa antioksidan seperti flavonoid mampu menurunkan dan menjaga keseimbangan kadar ROS dengan cara meningkatkan pembentukan enzim antioksidan seperti SOD⁷⁴⁻⁷⁷. Regulasi keseimbangan antara level ROS dan antioksidan sangat penting dalam beberapa jalur transduksi sinyal seluler diantaranya pengaturan penekanan

inflamasi⁶⁹. SOD adalah enzim yang secara bergantian mengubah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂⁷⁸.

Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak tanaman terbukti menghambat pelepasan stress oksidatif, mencegah berberbagai aktifitas faktor transkripsi seperti NF-κB, meningkatkan ekspresi enzim antioksidan dengan meningkatkan ekspresi *NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)* (Nrf-Keap1 pathway)⁷⁹⁻⁸². inhibisi NF-κB juga dapat menginduksi jalur IL-10 STAT3⁸³. Protein STAT3 akan masuk ke nucleus dan mencegah mengaktifasi sekuens mRNA SOSC3 yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu NF-κB. Penekanan pada jalur NF-κB akan menyebabkan penurunan ekspresi MITF sehingga akan menekan enzim tyrosinase untuk merubah L-DOPA menjadi melanin^{84,85}. Penghambatan ekspresi NF-κB dengan senyawa antioksidan seperti flavonoid pada krim ekstrak kulit beras hitam dapat menekan stress oksidatif sehingga menghambat produksi melanin.^{67,86} Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa flavonoid meningkatkan ekspresi Nrf2 yang menginduksi produksi berbagai enzim antioksidan superoxide dismutase, katalase, dan glutation peroksidase^{87,88}. Kondisi tersebut menekan ROS dan menghambat aktivasi NF-κB untuk mengaktifkan jalur sintesis melanin^{89,90}. struktur C-6 pada flavonoid menghambat ekspresi NF-κB *signaling pathway*⁹¹. Secara keseluruhan penelitian ini sudah berhasil membuktikan bahwa krim ekstrak beras hitam memiliki fungsi sebagai antioksidan 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 pada penelitian ini yaitu 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. Penelitian ini juga tidak menganalisis ekspresi MITF sebagai jalur utama produksi melanin. Disisi lain penelitian ini juga tidak menganalisa densitas kolagen sebagai parameter regenerasi jaringan dan perbaikan hiperpigmentasi. Penelitian ini juga belum dilanjutkan ke fase klinis dengan subjek kulit manusia untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak beras secara lebih lanjut terhadap kulit manusia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. 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 SOD pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.
2. Terdapat pengaruh secara signifikan pemberian krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% dan 15% secara topikal terhadap jumlah melanin pada kulit mencit model hiperpigmentasi yang diinduksi UVB.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan analisis mekanisme molekuler aksi krim ekstrak beras hitam pada jalur produksi melanin seperti jalur NF-kB dan MITF.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis efek dari kadar ROS dan efek dari 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 Ia1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 633–637.
- 2 Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Front Plant Sci* 2016; **6**: 1–10.
- 3 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.
- 4 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 Sci* 2018; **210**: 201–208.
- 5 Yin. W, Robyn. B, Alycia. N, Siegfired. H. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* 2018; **217**: 1915–1928.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Dale Wilson B, Moon S, Armstrong F. Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012; **5**: 18–23.
- 9 Merin KA, Shaji M, Kameswaran R. A Review on Sun Exposure and Skin Diseases. *Indian J Dermatol* 2022; **67**: 625.
- 10 Amaro-Ortiz A, Yan B, D’Orazio J. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules* 2014; **19**: 6202–6219.

- 11 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.
- 12 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.
- 13 Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
- 14 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.
- 15 Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients* 2016; **8**: 8–11.
- 16 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.
- 17 Miyazawa M, Oshima T, Koshio K, Itsuzaki Y, Anzai J. Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 6953–6956.
- 18 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.
- 19 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- κ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; **16**: 4277–4283.
- 20 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.
- 21 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.

- 22 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 Neurol* 2018; **27**: 129–138.
- 23 VARDHANI A, JUFRI M, PURWANINGSIH E. POTENCY OF Γ -ORYZANOL-RICH BLACK RICE BRAN (*ORYZA SATIVA* L. INDICA) EXTRACT FOR TYROSINASE INHIBITION. *Int J Pharm Pharm Sci* 2020; : 90–93.
- 24 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.
- 25 Astari L, Cahyono H, Widjajanto E. Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. *J Trop Life Sci* 2017; **7**: 286–292.
- 26 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.
- 27 Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord* 2019; **18**: 437–443.
- 28 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 29 Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol* 2016; **15**: 160–173.
- 30 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 31 Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**: 8962–8968.

- 32 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; **445**: 843–850.
- 33 Kumari S, Thng S, Verma N, Gautam H. Melanogenesis Inhibitors. *Acta Dermato Venereologica* 2018; **98**: 924–931.
- 34 Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, Jung S-H. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *J Med Chem* 2018; **61**: 7395–7418.
- 35 Nguyen NT, Fisher DE. <scp>MITF</scp> and <scp>UV</scp> responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 224–236.
- 36 Vance KW, Goding CR. The Transcription Network Regulating Melanocyte Development and Melanoma. *Pigment Cell Res* 2004; **17**: 318–325.
- 37 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.
- 38 Alam MB, Bajpai VK, Lee J, Zhao P, Byeon J-H, Ra J-S *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**: 45858.
- 39 Lee SE, Park S-H, Oh SW, Yoo JA, Kwon K, Park SJ *et al.* Beauvericin inhibits melanogenesis by regulating cAMP/PKA/CREB and LXR- α /p38 MAPK-mediated pathways. *Sci Rep* 2018; **8**: 14958.
- 40 Hong Y, Song B, Chen H-D, Gao X-H. Melanocytes and Skin Immunity. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2015; **17**: 37–39.
- 41 Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 101–110.
- 42 Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and <scp>MAP</scp>-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; **28**: 390–406.
- 43 Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 460–469.

- 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 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.
- 52 Musaogullari A, Mandato A, Chai YC. Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation on Caspase-3 Activation: A Study With the Kinase Inhibitor Staurosporine. *Front Physiol* 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00998.
- 53 Ramli S, Ruangrungsi N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. 2021.
- 54 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.
- 55 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; **14**: 3860–3873.

- 56 Ke Y, Wang X-J. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology* 2021; **141**: 1104–1110.
- 57 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 930164.
- 58 Speeckaert R, Van Gele M, Speeckaert MM, Lambert J, van Geel N. The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; **27**: 512–524.
- 59 Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**: 705–717.
- 60 Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 224–236.
- 61 Lee S-J. Suppression of α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int J Mol Med* 2011. doi:10.3892/ijmm.2011.807.
- 62 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.
- 63 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.
- 64 Tu Y, Quan T. Oxidative stress and human skin connective tissue aging. *Cosmetics* 2016; **3**: 1–12.
- 65 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.
- 66 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al.* UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.

- 67 Ryu A, Arakane K, Koide C, Arai H, Nagano T. Squalene as a Target Molecule in Skin Hyperpigmentation Caused by Singlet Oxygen. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 1504–1509.
- 68 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.
- 69 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 Sci* 2018; **210**: 201–208.
- 70 Yin. W, Robyn. B, Alycia. N, Siegfired. H. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* 2018; **217**: 1915–1928.
- 71 Oh CT, Lee D, Koo K, Lee J, Yoon HS, Choi YM *et al.* Superoxide Dismutase 1 Inhibits Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Ultraviolet B-Induced Melanogenesis in Murine Skin. *Annals of Dermatology* 2014; **26**: 681–687.
- 72 Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Frontiers in Plant Science* 2016; **6**: 1–10.
- 73 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.
- 74 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
- 75 Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA, Savarimuthu I. Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* 2017. doi:10.5772/68095.
- 76 Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci* 2018; **208**: 111–122.
- 77 Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 2014; **23**: 239–244.
- 78 Chakraborty K, Joseph D, Praveen NK. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *J Food Sci Technol* 2015; **52**: 1924–1935.

- 79 Ren H, Hao J, Liu T, Zhang D, Lv H, Song E *et al.* Hesperetin Suppresses Inflammatory Responses in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Cells via the Inhibition of NF- κ B and Activation of Nrf2/HO-1 Pathways. *Inflammation* 2016; **39**: 964–973.
- 80 van Nguyen T, Piao CH, Fan YJ, Shin DU, Kim SY, Song HJ *et al.* Anti-allergic rhinitis activity of α -lipoic acid via balancing Th17/Treg expression and enhancing Nrf2/HO-1 pathway signaling. *Sci Rep* 2020; **10**. doi:10.1038/s41598-020-69234-1.
- 81 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017; **1863**: 585–597.
- 82 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; **1863**: 585–597.
- 83 Huang YH, Chen MH, Guo QL, Chen ZX, Chen QD, Wang XZ. Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis. *Cell Signal* 2020; **66**: 109445.
- 84 Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey AC, Penas FN *et al.* IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org 2019; **1**: 1267.
- 85 Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 170–181.
- 86 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.
- 87 Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; **53**: 401–426.
- 88 Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* 2020; **25**: 1–31.
- 89 Jha K, Shukla M, Pandey M. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surg Oncol.* 2012; **21**: 125–131.

- 90 Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research* 2015; **142**: 389–397.
- 91 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- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.

