

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS
HITAM TERHADAP EKSPRESI
TGF- β DAN TNF- α**

(Studi Eksperimental *in Vivo* pada Mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi)

Tesis

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



Magister Ilmu Biomedik

**Maryanti
MBK.23.21.010362**

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

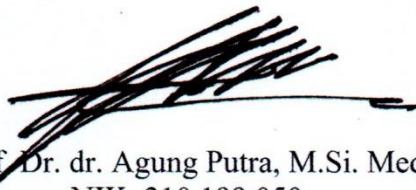
TESIS
PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS
HITAM TERHADAP EKSPRESI
TGF- β DAN TNF- α
(Studi Eksperimental *in Vivo* pada Mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi)

disusun oleh:

Maryanti
MBK.23.21.010362

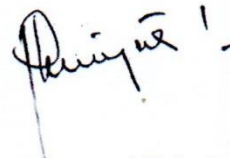
Yang dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 22 November 2024 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui:

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E,
Subsp.D.K.E, FINSVD, FAADV
NIDN: 8951110021

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



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS
NIK 210 113 160

PERNYATAAN

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

Semarang, 5 Desember 2024



Maryanti
MBK.23.21.010362

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Pertama-tama penulis mengucapkan Alhamdulillahirrabbi lalamin puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan nikmat sehat dan keberkahanNya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan proposal tesis ini untuk memenuhi dan melengkapi tugas akhir program magister pasca sarjana (S2). Salawat serta salam selalu tercurah kepada Baginda Nabi Besar Muhammad Sallallahu alaihi wassallam yang selalu menginspirasi untuk senantiasa memberikan kebermanfaatan kepada sesama.

Pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal tesis dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK BERAS HITAM TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α (Studi Eksperimental *in Vivo* pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi)” selama penulisan proposal tesis ini, penulis banyak mendapatkan dukungan, bimbingan, dan bantuan baik moril dan materil dari berbagai pihak. Oleh karenanya penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang tidak terhingga 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 Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr.dr. Setyo Trisnadi., SH, Sp.KF dan jajarannya selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program Magister Biomedik ini.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra., M.Si., Med selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam menyelesaikan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E, FINSADV, FAADV selaku pembimbing II yang telah berkenan membimbing penulis dan memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam penyusunan laporan tesis.

5. Dr. dr. Pasid Harlisa Sp. D. V. E. FINSADV, FAADV selaku penguji I, Dr. Dra. Atina Husaana, Msi. Apt selaku penguji II, dan Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. F selaku penguji ke III yang telah berkenan menguji dan memberikan segala masukan, kritik serta saran yang konstruktif dalam penyusunan tesis ini,
6. Semua dosen program Magister Biomedik yang telah memberikan bekal ilmu dan filosofi pengetahuan selama berlangsungnya proses Pendidikan sehingga mendapatkan bekal yang sangat berharga dalam perjalanan penelitian ini.
7. Orangtua, adik serta keponakan tersayang yang menjadi support sistem, dan doanya tidak pernah putus untuk penulis.
8. Terima kasih penulis ucapkan atas arahan, masukan dan support yang luar biasa kepada dr. Bayu Dwi Siswanto, M.Si, Dipl.CIDESCO yang penulis anggap bukan hanya sebagai atasan, tapi juga sebagai Coach, serta Ibu Dewi Nur Rahmawati.
9. Team Wacana Drama yang selalu sesuai dengan namanya selalu Wacana dan Drama, terima kasih untuk support kalian semua.

Akhirnya penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan. Untuk itu saran dan masukannya akan sangat membantu agar proposal tesis ini dapat menjadi lebih baik.

Semarang, November 2024

Maryanti

MBK.23.21.010362

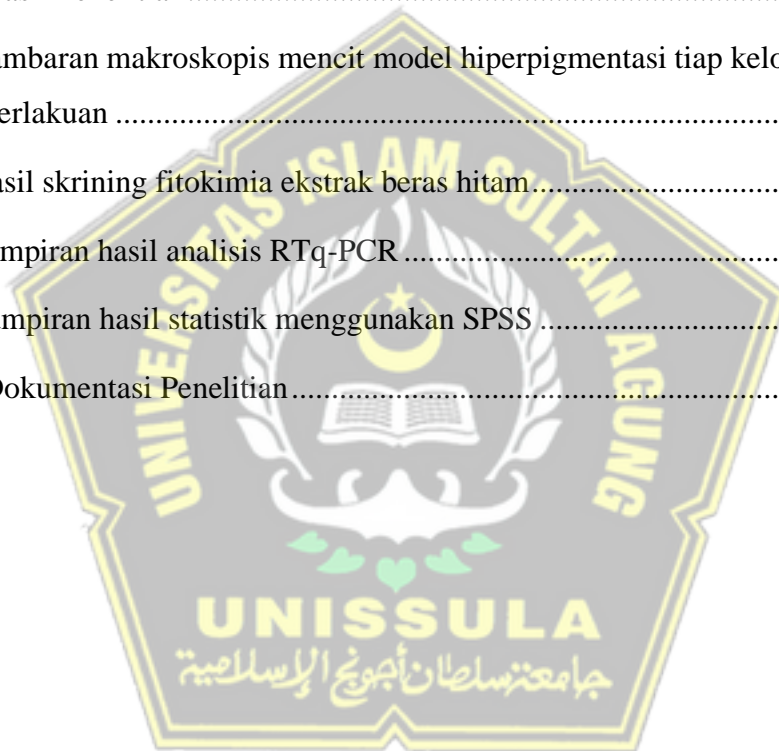
DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
1.5 Originalitas Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Paparan Sinar Ultraviolet-B (UV-B).....	7
2.1.2 Paparan UVB meyebabkan <i>Hiperpigmentasi</i>	8
2.2 <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- α).....	10
2.2.1 Defenisi TNF- α	10

2.2.2 Mekanisme aktivasi TNF- α	12
2.2.3 Peran TNF- α pada hiperpigmentasi	13
2.3 <i>Transforming growth factor beta</i> (TGF- β).....	14
2.3.1 Defenisi TGF- β	14
2.3.2 Mekanisme aktivasi TGF- β	15
2.3.3 Peran TGF- β pada hiperpigmentasi	17
2.4 Beras hitam (<i>Oryza sativa</i> L. var <i>glutinosa</i>).....	18
2.4.1 Klasifikasi tanaman beras hitam	18
2.4.2 Senyawa Bioaktif Beras Hitam.....	21
2.5 Mekanisme antioksidan dalam memperbaiki hiperpigmentasi.....	22
2.6 Mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi	26
2.7 Pengaruh pemberian ekstrak beras hitam terhadap kadar TNF- α dan TGF- β akibat dipapar sinar UV	29
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	31
3.1 Kerangka teori	31
3.2 Kerangka Konsep	34
3.3 Hipotesis	34
BAB IV METODE PENELITIAN	35
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	35
4.1.1 Jenis Penelitian	35
4.1.2 Rancangan Penelitian.....	35
4.1.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	36
4.2 Besar Sampel.....	36
4.3 Teknik Sampling Penelitian	37
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	37

4.4.1 Variabel Penelitian.....	37
4.5 Definisi Operasional.....	38
4.6 Bahan atau Materi Penelitian.....	39
4.7 Cara Penelitian dan Alur kerja	39
4.7.1 Perolehan Ethical Clearance	39
4.7.2 Pembuatan Ekstrak beras hitam.....	39
4.7.3 Pembuatan sediaan krim ekstrak beras hitam	40
4.7.4 Persiapan Hewan Uji	41
4.7.5 Paparan UV-B pada mencit model Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan	42
4.7.6 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit.....	42
4.7.7 Pengecekan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin.....	43
4.7 Metode Analisis Data	44
4.9 Tempat dan Waktu Penelitian	45
4.10 Alur Penelitian.....	46
Analisis ekspresi TGF- β dan TNF- α Menggunakan Metode RTq-PCR	46
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	47
5.1 Hasil Penelitian.....	47
5.1.1 Hasil Analisis Fitokimia Ekstrak Beras Hitam	47
5.1.2 Validasi Makroskopis dan Pewarnaan <i>Masson Fontana</i> Mencit Model Hiperpigmentasi.....	48
5.1.3 Hasil Analisis pengaruh krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi TGF- β pada mencit model hiperpigmentasi	50
5.1.4 Hasil Analisis pengaruh krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi	53
5.2 Pembahasan	57

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	61
6.1. Kesimpulan.....	61
6.2. Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA	62
Lampiran	69
1. <i>Ethichal Clearance</i>	69
2. Hasil Penelitian.....	70
a. Gambaran makroskopis mencit model hiperpigmentasi tiap kelompok perlakuan	70
b. Hasil skrining fitokimia ekstrak beras hitam.....	71
c. Lampiran hasil analisis RTq-PCR.....	72
d. Lampiran hasil statistik menggunakan SPSS	74
3. Dokumentasi Penelitian.....	77



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sinar Ultraviolet.....	7
Gambar 2.2 Mekanisme hiperpigmentasi.....	9
Gambar 2.3 TNF- α pathway.....	12
Gambar 2.4 Peran TGF- β menghambat melanogenesis.....	17
Gambar 2.5 Tanaman beras hitam.....	20
Gambar 3.1 Skema kerangka teori.....	33
Gambar 3.2 Kerangka Konsep.....	34
Gambar 4.1 Skema Rancangan penelitian.....	35
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	46



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 5.1 Hasil Analisis kandungan ekstrak beras hitam	48
Tabel 5.2 Data hasil penelitian ekspresi TGF- β	50
Tabel 5.3 Uji <i>Post hoc tamhane</i> ekspresi TGF- β pada tiap kelompok	52
Tabel 5.4 Data hasil penelitian ekspresi TNF- α	54
Tabel 5.5 Uji <i>Post hoc tamhane</i> ekspresi TNF- α pada tiap kelompok	56



ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperpigmentasi merupakan salah satu tanda penuaan pada kulit yang terjadi akibat peningkatan jumlah melanin. Radiasi UVB merupakan penyebab paling umum terjadinya pigmentasi kulit. Beras hitam (*Oryza sativa* L. var *glutinosa*) bermanfaat untuk kesehatan juga memiliki manfaat bagi kecantikan kulit, memiliki kandungan tinggi antioksidan, dapat memberi efek melembabkan dan memicu regenerasi sel baru. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B.

Metode: penelitian eksperimen *Post Test Only Control Group Design* menggunakan 28 ekor mencit C57BL/6 dengan 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok mencit sehat tanpa perlakuan (K1), kelompok kontrol negatif (K2) mencit dipapar sinar UV-B tanpa intervensi, Kelompok perlakuan 1 (K3) mencit dipapar sinar UV-B dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5%, dan Kelompok perlakuan 2 (K4) mencit dipapar sinar UV-B dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 15%. Dilakukan pengambilan jaringan dan diamati dari jaringan mencit yang dipapar sinar UVB. Ekspresi TGF- β dan TNF- α pada jaringan kulit mencit dianalisis dengan metode RTq-PCR kemudian analisa data menggunakan uji statistik *One way anova*.

Hasil: Rerata ekspresi gen TGF- β paling tinggi pada kelompok K4 $1,87 \pm 0,23$, kelompok K3 $1,52 \pm 0,42$, kelompok K4 $1,87 \pm 0,23$, kelompok kontrol K2 $0,55 \pm 0,11$, uji *One way anova* $p=0,000$ ($p<0,05$) terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi gen TGF- β antar kelompok.

Rerata ekspresi gen TNF- α paling rendah pada kelompok K4 $1,92 \pm 1,02$, kelompok K3 $5,40 \pm 2,28$ dan kelompok K2 sebesar $8,27 \pm 4,25$. uji *One way anova* menunjukkan hasil $p=0,000$ ($p<0,05$) terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi gen TNF- α antar kelompok.

Kesimpulan: pemberian krim ekstrak beras hitam meningkatkan ekspresi TGF- β dan menurunkan ekspresi gen TNF- α akibat paparan sinar UVB.

Kata Kunci: Krim ekstrak beras hitam, ekspresi TGF- β , ekspresi TNF- α

ABSTRACT

Background: Hyperpigmentation is one of the signs of aging on the skin that occurs due to increased melanin levels. UVB radiation is the most common cause of skin pigmentation. Black rice (*Oryza sativa* L. var *glutinosa*) is beneficial for health and also has benefits for skin beauty, has a high antioxidant content, can provide a moisturizing effect and trigger new cell regeneration. The study aims to determine the effect of black rice cream on the expression of TGF- β and TNF- α in hyperpigmentation model mice exposed to UV-B rays.

Method: experimental research Post Test Only Control Group Design using 28 C57BL/6 mice with 4 treatment groups, namely a group of healthy mice without treatment (K1), a negative control group (K2) mice exposed to UV-B rays without intervention, Treatment Group 1 (K3) mice exposed to UV-B rays and given black rice extract cream at a dose of 7.5%, and Treatment Group 2 (K4) mice exposed to UV-B rays and given black rice extract cream at a dose of 15%. The expression of TGF- β and TNF- α in mouse skin tissue was analyzed using the RTq-PCR method, then the data was analyzed using the One-way ANOVA statistical test.

Results: The highest mean TGF- β gene expression was in the K4 group 1.87 ± 0.23 , the K3 group 1.52 ± 0.42 , the K4 group 1.87 ± 0.23 , the K2 control group 0.55 ± 0.11 , One way anova test $p=0.000$ ($p<0.05$) there was a significant difference in the mean TGF- β gene expression between groups. The lowest mean TNF- α gene expression was in the K4 group 1.92 ± 1.02 , the K3 group 5.40 ± 2.28 and the K2 group 8.27 ± 4.25 . The One way anova test showed the results $p=0.000$ ($p<0.05$) there was a significant difference in the mean TNF- α gene expression between groups.

Conclusion: administration of black rice extract cream increases TGF- β expression and decreases TNF- α gene expression due to UVB exposure.

Keywords: Black rice extract cream, TGF- β expression, TNF- α expression

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paparan sinar ultraviolet (UV) secara terus-menerus menyebabkan perubahan struktur dan fungsi kulit, sampai pada efek samping kronis seperti hiperpigmentasi dan kanker kulit.¹ Hiperpigmentasi merupakan salah satu tanda penuaan pada kulit, yang terjadi akibat peningkatan jumlah melanin.² Paparan UV merupakan penyebab paling umum dari pigmentasi kulit. Peningkatan *Radical Oxygen Species* (ROS) di sel kulit akibat paparan UV,³ mengaktifkan jalur pensinyalan keratinosit dan fibroblas di dermis, yang menyebabkan aktivasi gen inflamasi *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α).⁴ Kemampuan melawan stres oksidatif menurun, mengakibatkan peningkatan ekspresi TNF- α , mengaktifkan jalur MAPK, NF- κ B, dan reseptor faktor pertumbuhan seperti penurunan ekspresi *Transforming growth factor* (TGF- β).⁵ TGF- β secara efektif menekan melanogenesis, menghambat akumulasi melanin dan aktivitas tirosinase melalui penurunan regulasi jalur kinase yang diatur sinyal ekstraseluler (ERK)/faktor transkripsi terkait mikroftalmia (MITF).⁶ TGF- β dapat menjadi agen pertahanan komprehensif terhadap gangguan hiperpigmentasi kulit terkait UV.⁷

Hiperpigmentasi sangat umum terjadi dan merupakan masalah terpenting dalam photoaging.² Bahan pencerah kulit yang bekerja sebagai *tyrosinase inhibitor* telah banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, di antaranya adalah asam askorbat, arbutin, asam kojik, dan hidrokuinon yang memiliki efek dermatitis alergi atau iritan dan okronosis.⁸ Oleh

karena itu penggunaannya saat ini sudah mulai sangat dibatasi. Gangguan hiperpigmentasi diobati dengan berbagai agen pencerah kulit, namun pengobatan ini tidak sepenuhnya memberantas lesi kulit. Dengan demikian, ada kebutuhan yang meningkat untuk mengembangkan pilihan pengobatan alternatif yang lebih spesifik dan efektif.⁹ Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dicari bahan-bahan pencerah kulit lain yang bersifat alami dengan efek samping yang lebih sedikit.¹⁰

Peneliti dermatologi berupaya untuk mengidentifikasi kandidat yang cocok yang dapat secara efektif menekan melanogenesis dan memiliki efek menguntungkan pada kulit yang menua akibat photoaging.⁶ Memanfaatkan target terapi photoaging kulit dengan aplikasi topikal menggunakan bahan alami menjadi pilihan karena efek sampingnya sangat sedikit dan ketersediaannya mudah, dibandingkan dengan bahan sintesis.¹¹ Aplikasi topikal konvensional yang dapat mengubah warna kulit lebih gelap.¹² Menyebabkan efek dermatitis alergi/iritan dan okronosis.¹³ Salah satu bahan alam yang dapat digunakan ialah beras hitam (*Oryza sativa* L. var *glutinosa*) yang memiliki kandungan tinggi antioksidan, dapat memberi efek melembabkan dan memicu regenerasi sel baru.¹⁴ Beras hitam memiliki beraneka manfaat diantaranya sebagai antiinflamasi, senyawa anti mikroba, memiliki aktivitas anti-karsinogenik, memperbaiki penglihatan, menginduksi apoptosis, dan efek neuroprotektif.¹⁴

Aplikasi dengan sediaan krim yang memiliki konsistensi yang lebih kental, memiliki persentase air yang lebih sedikit, dengan kandungan minyak berlebih mudah untuk meresap ke dalam kulit.¹⁵ Penelitian melaporkan menggunakan krim yang mengandung 10% ekstrak beras hitam efektif sebagai pencerah kulit karena

efektif menurunkan produksi melani pada kulit.¹⁹ penelitian lain melaporkan bahwa sediaan krim lulur yang menggunakan ekstrak beras hitam dengan konsentrasi 3%, 6% dan 9% tidak mengiritasi kulit dan dapat memberikan efek melembabkan pada kulit.¹⁸

Hasil penelitian menggunakan formulasi produk *bodyscrub* yaitu penambahan beras ketan hitam dan madu sebesar 4,6% dengan karakteristik aroma sedikit berbau, tekstur lebih banyak butiran *scrub*, memiliki pH 7, tidak menyebabkan iritasi kulit, dapat melembabkan kulit serta memiliki kestabilan emulsi yang baik.¹⁴ Laporan tentang penelitian krim dari ekstrak beras hitam secara *in vivo* masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini akan menganalisis pengaruh sediaan krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit C57BL/6 jantan model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

Adakah pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β pada mencit model hiperpigmentasi
- b. Untuk mengetahui pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Sebagai literasi tambahan tentang pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai informasi kepada masyarakat tentang pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi.

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Prasetyo, Bayu & Purwono, Rini & Novarino, Alvin. (2021).	Potensi Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Ekstrak Beras Hitam (<i>Oryza Sativa L Indica</i>) dan Penghambatan Tirosinase	Experimen <i>in vitro</i>	Ekstrak beras hitam berpotensi menghambat pembentukan melanin, sehingga dapat digunakan sebagai bahan aktif dalam suatu produk pencerah kulit. ⁷³
2	Nisa K, (2019)	Formulasi Sediaan Krim Lulur Dari Ekstrak Beras	Experimen, <i>In Vitro</i>	Sediaan krim lulur menggunakan bahan dasar ekstrak beras ketan hitam dengan variasi konsentrasi 3%, 6% dan 9%. Ekstrak beras ketan hitam (<i>Oryza sativa</i>

		Ketan Hitam (<i>Oryza sativa</i> <i>L. var</i> <i>glutinosa</i>) Sebagai Pelembab Alami Kulit.		<i>L. var glutinosa</i>) dapat diformulasikan sebagai krim lulur, tidak mengiritasi kulit, dan dapat memberikan efek melembabkan pada kulit. ¹⁶
3	Mahdi Jufri, Afifah Vardhani, Erni Purwaningsih ¹⁷	<i>Evaluating the Efficacy of Krim Containing Black Rice Bran (Oryza sativa L. indica) Extract as Skin Brightening Agent: A Clinical Trial</i>	Exper iment al, <i>in</i> <i>vivo</i>	Krim yang mengandung 10% ekstrak beras hitam ini efektif sebagai pencerah kulit karena efektif menurunkan produksi melanin pada kulit
4	Singh M, Mansuri MS, Kadam A, et al. (2021)	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha affects melanocyte survival and melanin synthesis via multiple pathways in vitiligo. Cytokine.</i>	Eksp erime ntal, <i>ex</i> <i>vivo</i>	Hasil menunjukkan peningkatan transkrip TNF- α pada kulit lesi dan non-lesi vitiligenosa. Melanosit setelah stimulasi eksogen dengan TNF- α menunjukkan penurunan viabilitas sel yang signifikan dengan peningkatan ROS seluler dan mitokondria serta aktivitas kompleks I yang terganggu. Penurunan kandungan melanin melalui pelepasan dendrit, penurunan regulasi MITF-M, TYR dan peningkatan regulasi ekspresi TNFR1, IL6, ICAM1, sedangkan kadar TNFR2 tetap tidak berubah. Paparan TNF- α menstimulasi apoptosis sel pada 48 jam dan autofagi pada 12 jam, meningkatkan transkrip ATG12 dan BECN1. Fungsi utama TNF- α dalam homeostasis melanosit dan patogenesis vitiligo autoimun. ¹⁸
5	Wulandari MAM, Wiraguna AAGP, Pangkahila W. (2023)	<i>Peppermint Leaf Extract Cream Increased Transforming Growth</i>	Exper iment al, <i>In</i> <i>Vivo</i>	Daun peppermint mengandung flavonoid, menthofuran, dan senyawa fenolik lainnya yang memiliki aktivitas antioksidan. Pemberian krim ekstrak daun peppermint 5% efektif meningkatkan ekspresi TGF- β dan

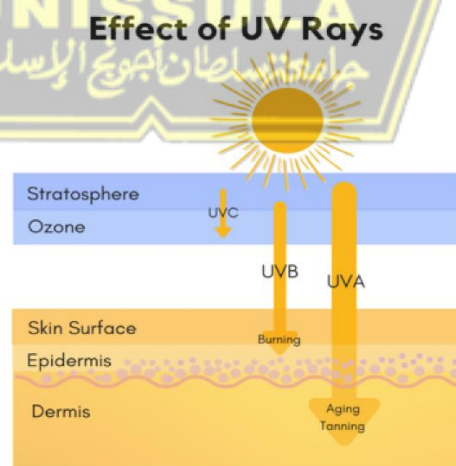
		<i>Factor β (TGF-β) Expression and Collagen Amount In The Male Wistar Rat's Skin Exposed to UVB.</i>		jumlah kolagen pada kulit tikus Wistar jantan yang terpapar UVB dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok yang hanya terpapar UVB. ¹⁹
6	Kartini, N., Wijaya, C. D., & Hidayat, A. (2024).	The Effect of Giving Black Rice Extract Ointment (Oryza Sativa L. Indica) on the Growth of Wistar Rat (Rattus Novergicus) Hair Follicles.	Exper iment al, <i>In Vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Aplikasi topikal salep ekstrak beras hitam 10% atau 20% secara signifikan meningkatkan pertumbuhan rambut pada tikus, aplikasi harian konsentrasi 30% memiliki pertumbuhan rambut paling panjang dari kelompok yang diuji (0,851 cm pada hari pengamatan ke-21), diikuti oleh konsentrasi 20% dan 10%. Ekstrak beras hitam mengandung antioksidan tinggi (nilai konsentrasi ppm <50) yang dapat mencegah penuaan dini pada kulit dan meningkatkan kesehatan rambut dan kulit. ²⁰
7	Daud NS, Ode L, Al Z. (2016)	Formulasi lotion tabir surya ekstrak etanol beras merah (Oryza nivara).	Exper iment al, <i>In Vitro</i>	Beras merah yang mengandung pigmen warna antosianin. Formulasi lotion tabir surya ekstrak etanol beras merah memiliki efek tabir surya dan stabil. uji stabilitas menunjukkan ketiga formula tetap homogen dan tidak mengalami inversi fase dengan tipe emulsi minyak dalam air setelah cycling test. Aroma khas minyak mawar berkurang dan bentuk sediaan menjadi lebih cair menyebabkan daya sebar menjadi semakin luas. Nilai SPF semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yaitu 5,30 (proteksi sedang), 6,30 (proteksi ekstra) dan 7,00 (proteksi ekstra) untuk masing-masing formula. Basis lotion tidak mempengaruhi aktivitas tabir surya lotion dengan nilai SPF 1,76. ²¹

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paparan Sinar Ultraviolet-B (UV-B)

Paparan sinar ultraviolet (UV) yang membentuk suatu radikal bebas pada kulit merupakan salah satu yang menimbulkan efek langsung terhadap kesehatan kulit manusia. Terdapat tiga jenis kategori radiasi UV, yaitu: UV-C dengan panjang gelombang yang terpendek (100-290 nm). Panjang gelombang yang lebih pendek dari 290 nm tidak ada yang mencapai permukaan bumi, hal ini disebabkan filtrasi oleh lapisan ozon. Sinar UV-B (290-320 nm) yang mencapai permukaan bumi dan bertanggung jawab terhadap atas sebagian besar terjadinya fotobiologi pada kulit. Sinar UV-A (320-400 nm) mampu melewati kaca jendela dan dibagi menjadi UV-A1 (340-400 nm) dan UV-A2 (320-340 nm). Lapisan stratosfer dari ozon yang terus menipis mengakibatkan semakin banyak jumlah radiasi UV-B yang mencapai permukaan bumi.²²



Gambar 2.1 Sinar Ultraviolet.²²

Radiasi sinar UV-B dapat menembus dan merusak hingga lapisan dermis

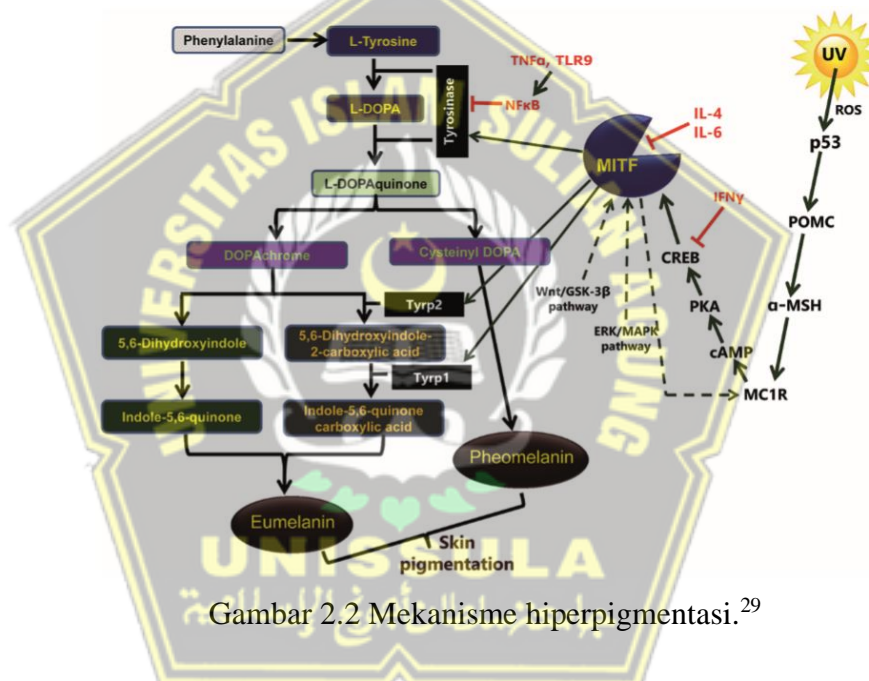
sebesar 20-50 kali lebih kuat dibandingkan dengan sinar UV-A.²³ Menyebabkan peningkatan ROS, merusak DNA, dan mengganggu fungsi penghalang kulit. Serta mengaktifkan reseptor inflamasi.²⁴

Sinar UV-B juga membantu tubuh memproduksi vitamin D, yang penting untuk sistem kekebalan tubuh.²⁵ Namun, dapat menyebabkan kulit terbakar yang ditandai dengan kemerahan, nyeri, dan peradangan pada kulit, menembus lapisan terluar kulit, epidermis, dan merusak DNA sel-sel kulit, yang mengarah pada pelepasan mediator inflamasi dan aktivasi sel-sel imun.²⁶ Respon pertama berupa pelepasan sitokin pro-inflamasi, seperti *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), yang bertanggung jawab atas kemerahan, nyeri, dan pembengkakan yang disebabkan oleh paparan UV-B.²⁷ Namun, paparan UVB juga dapat menyebabkan respons anti-inflamasi pada kulit, seperti pelepasan *interleukin 10* (IL-10) dan mengubah *Transforming growth factor beta* (TGF- β) yang membantu menekan respons pro-inflamasi dan meningkatkan perbaikan jaringan.²⁸

2.1.2 Paparan UVB menyebabkan Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi terjadi akibat kulit terpapar sinar UV-B secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UV-B berperan dalam terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*.²⁹ 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.³⁰

Hiperpigmentasi merupakan penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UV-B, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UV-B buatan. *Photoaging* berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UV-B mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan.³¹ Penyebab utama kerusakan manifestasi penuaan kulit berupa hiperpigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.²⁹



Gambar 2.2 Mekanisme hiperpigmentasi.²⁹

Paparan UV-B menginduksi melanogenesis melalui p53 memicu peningkatan ekspresi POMC untuk mensekresikan α -MSH yang mengatur ekspresi MITF, selanjutnya memicu enzim tyrosinase, Tyrp1 dan Tyrp2. Selain itu, radiasi UV-B meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dalam sel keratin dan melanosit, dan pada konsentrasi tinggi ROS menyebabkan kerusakan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut, dan dengan demikian memicu melanogenesis. Melanosit adalah faktor aktif dalam sistem imun

kulit, memainkan peran penting dalam respons imun, dan memiliki sifat modulasi imun. TNF- α menghambat melanogenesis terutama melalui faktor nuklir kappa B (NF- κ B) dan mengurangi waktu paruh tyrosinase.⁹

2.2 *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α)

2.2.1 Defenisi TNF- α

TNF- α adalah sitokin proinflamasi dan pleiotropik yang terutama diproduksi oleh makrofag, monosit, sel T, dan sel NK. TNF- α juga disekresikan oleh berbagai sel lain, termasuk fibroblas, keratinosit, sel otot polos, dan sel tumor.³² TNF- α merupakan protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino, terutama dihasilkan oleh makrofag aktif, limfosit T, dan sel NK. Secara fungsional diketahui memicu serangkaian berbagai molekul inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin lainnya. Secara umum, TNF- α mengikat reseptornya, terutama TNFR1 dan TNFR2, dan kemudian mentransmisikan sinyal molekuler untuk fungsi biologis seperti peradangan dan kematian sel.³²

Dua jenis TNF- α adalah bentuk terlarut (sTNF- α) dan bentuk transmembran (tmTNF- α). TNF- α terutama memengaruhi sel dengan mengikat reseptor TNFR1 (p55) dan TNFR2 (p75), yang kemudian mengirimkan sinyal molekuler untuk berbagai tujuan biologis, termasuk menjadi reseptor yang mengontrol respons imun dan mampu menyebabkan berbagai efek seluler termasuk apoptosis, nekroptosis, peradangan, efek proliferaatif atau merangsang pertumbuhan, dan efek hematopoietik.^{32,33} TNFR1 memicu jalur pensinyalan aktivasi NF κ B dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), dikenal dengan pensinyalan kompleks 1 sebagai induksi peradangan jaringan, kelangsungan hidup

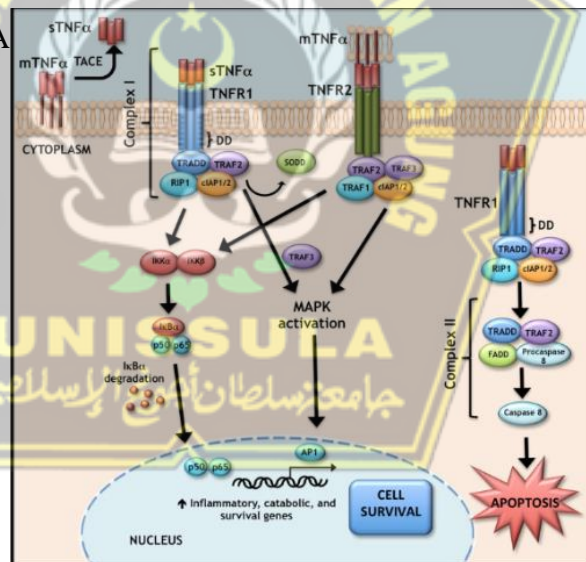
dan proliferasi sel, dan pertahanan kekebalan terhadap pathogen. TNFR1 sangat penting untuk menginduksi respons TNF- α sitotoksik dan proinflamasi, sementara TNFR2 sebagian besar dapat memediasi aktivasi, migrasi, atau proliferasi sel.³²

TNF- α disintesis oleh sel sebagai protein transmembran tipe II 26 kDa yang disebut mTNF. Bentuk terikat membran ini diproses menjadi bentuk larut 17 kDa, sTNF, oleh enzim pengubah nekrosis- α -konversi tumor metalloproteinase (TACE) yang juga dikenal sebagai ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17). Bentuk trimerik dari mTNF dan sTNF aktif secara biologis, meskipun bentuk monomer dan dimer juga.³⁴

TNF- α berinteraksi dengan salah satu dari dua reseptor superfamili reseptor TNFR1 dan TNFR2. mTNF dapat mengikat salah satu reseptor, sedangkan sTNF hanya dapat mengikat TNFR1. Aktivasi TNFR1 oleh TNF- α mengarah pada pembentukan dua kompleks pensinyalan TNF yang berbeda: Kompleks I memiliki fungsi anti-apoptosis, sedangkan Kompleks II/kompleks pensinyalan penginduksi kematian (DISC) menginduksi apoptosis setelah internalisasi reseptor. TNFR2, sebaliknya, tidak memiliki domain kematian intraseluler. Oleh karena itu, pemberian sinyal melalui kompleks ini dianggap anti-apoptosis. Namun, bukti terbaru menunjukkan bahwa TNFR2 dapat menginduksi degradasi TRAF2 yang mengakibatkan terjadinya *crosstalk* antara jalur TNFR1 dan TNFR2. Pemberian sinyal melalui Kompleks I mengaktifkan jalur faktor nuklir κ B (NF- κ B) dan jalur mitogen activation protein kinase (MAPK).³⁴

2.2.2 Mekanisme aktivasi TNF- α

TNF- α yang dilepaskan secara epidermal berikatan dengan reseptor spesifiknya TNFR yang sebagian besar diekspresikan di jaringan kulit. Selanjutnya, merekrut TRADD, diikuti oleh protein yang berinteraksi dengan reseptor 1 (RIP1) dan protein TRAF2, mediator utama dalam pensinyalan yang dimediasi TNFR1. TRAF2 adalah anggota keluarga TRAF dari adaptor sitoplasma dan protein perancah yang diekspresikan di mana-mana yang dapat menjalani homo atau hetero-oligomerisasi dengan anggota TRAF lainnya, TRAF1, TRAF5, dan TRAF6. TRAF2 secara langsung berikatan dengan domain sitoplasma CD27, CD30, CD40, dan TNFR2 melalui bagian terminal-C dari domain TRA



Gambar 2.3 TNF- α pathway. ³⁵

TNF yang terikat membran (mTNF) diproses oleh metalloproteinase TACE/ADAM-17 menjadi bentuk larut (sTNF). sTNF- α atau mTNF- α dapat mengikat reseptor TNFR1 transmembran, menyebabkan perubahan konformasi

yang melepaskan protein penghambat SODD. Pengikatan menghasilkan perekrutan beberapa faktor termasuk TRADD, RIP1, TRAF2, dan cIAP 1 dan 2 yang menghasilkan pembentukan kompleks I yang memberi sinyal melalui jalur NF- κ B atau MAPK untuk mengaktifkan p65 atau AP1. Pensinyalan kompleks I menghasilkan transkripsi gen inflamasi (kemokin, sitokin) dan matriks katabolik (MMPs, ADAMTSs) serta gen pro-survival (cIAP1 dan 2, cFLIP, TRAF1, TRAF2). Alternatifnya, mTNF- α dapat mengaktifkan reseptor TNFR2 untuk membentuk kaskade pensinyalan kompleks dan hilir yang serupa. Dalam beberapa kasus, TNFR1 yang terikat pada sTNF- α dapat diinternalisasi dan memulai pembentukan Kompleks II atau DISC yang menyebabkan pembelahan procaspase 8 dan akhirnya apoptosis sel.³⁵

2.2.3 Peran TNF- α pada hiperpigmentasi

Paparan UVB meningkatkan sekresi TNF- α , memicu tyrosinase melalui pensinyalan intraseluler spesifik, diaktifkan setelah pengikatan endothelin-1 (EDN1) atau *stem cell factor* (SCF) terhadap masing-masing reseptor endothelin B (EDNRB) atau reseptor *stem cell growth factor*, yang dikenal sebagai proto-oncogen c-KIT (c-KIT), selanjutnya terjadi aktivasi melanosit menghasilkan stimulasi pigmentasi epidermis.³⁶

Kerusakan yang disebabkan oleh peradangan pada keratinosit basal melepaskan sejumlah besar melanin. Pigmen bebas tersebut kemudian difagositosis oleh makrofag, yang sekarang disebut melanofag, di dermis atas dan menghasilkan tampilan kulit berwarna biru-abu-abu di lokasi cedera.

Gangguan hiperpigmentasi, menyebabkan kondisi kulit fotosensitif yang

diperburuk oleh paparan UV. Mekanisme respons inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.³⁷ Kulit manusia dicirikan oleh keragaman warna dan corak yang signifikan, yang ditentukan oleh kuantitas dan distribusi pigmen melanin di epidermis, jenis kulit yang lebih gelap dianggap terlindungi dengan baik dari kerusakan foto karena kandungan melanin yang tinggi.³⁸

Peradangan berkontribusi terhadap kerusakan lapisan basal epidermis dan bertindak sebagai pemicu bagi melanosit untuk melepaskan melanosom yang mengandung pigmen ke sel-sel kulit di sekitarnya; butiran pigmen dapat bertahan untuk waktu yang lama menyebabkan perubahan warna epidermis. Hal ini dapat memengaruhi epidermis, sitokin, kemokin, dan ROS yang dilepaskan selama peradangan sehingga merangsang pertumbuhan melanosit serta sintesis melanin dan pengangkutannya ke keratinosit di sekitarnya. Di antara faktor-faktor fisiologis yang mendorong terjadinya peristiwa ini adalah faktor pertumbuhan epidermal (EGF), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), TNF- α serta leukotrien seperti LTC₄ dan LTD₄, prostaglandin E₂ dan D₂, dan tromboksan. Pigmen biasanya meningkat di kompartemen basal epidermis, yang juga disertai dengan peningkatan ekspresi antibodi penanda melanoma (NKI/beteb) dan enzim metaloproteinase 2 (MMP-2).³⁷

2.3 Transforming growth factor beta (TGF- β)

2.3.1 Defenisi TGF- β

TGF- β terdiri dari 3 isoform, TGF- β 1, 2, dan 3, yang diekspresikan dalam berbagai jenis sel dan jaringan dengan TGF- β 1 paling dominan.³⁹

Superfamili TGF- β yang mencakup protein morfogenik tulang (BMP), nodal, faktor pertumbuhan dan diferensiasi (GDF), dan aktivin.⁴⁰ Ligan TGF- β disintesis sebagai protein prekursor lebih besar yang bagian N-terminalnya dibelah untuk melepaskan *C-terminal ligand* yang matang dalam bentuk homodimer. Peptida N-terminal yang dibelah (*latency associated peptide, LAP*) secara fisik berikatan dengan *C-terminal ligand*. Aktivitas homodimer TGF- β dewasa diasingkan oleh protein pengikat TGF- β laten (LTBPs), yang disebut TGF- β s laten. TGF- β aktif dapat dilepaskan melalui pencernaan enzimatik atau lingkungan mikro asam.⁴⁰

TGF- β memiliki dampak pleiotropik dan terkadang antagonis pada proses seluler seperti kematian sel, migrasi, diferensiasi, dan proliferasi.²⁹ Efek TGF- β bergantung pada beberapa sitokin lain. Efek biologis TGF- β dimodulasi oleh sitokin mitogeniknya yang berfungsi membalikkan efek penghambatan TGF- β dan meningkatkan kelangsungan hidup sel induk hematopoietik dan mencegah penghambatan TGF- β pada sel.³⁰

2.3.2 Mekanisme aktivasi TGF- β

Jalur pensinyalan TGF- β memainkan peran dalam diferensiasi sel dengan mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel dan perbaikan inflamasi. Proses perkembangan dipengaruhi oleh faktor internal yang terdiri dari epigenetik dan faktor transkripsi penting, sedangkan faktor eksternal yang mempengaruhinya terdiri dari inhibitor dan jalur sinyal. TGF- β berperan dalam mengaktifkan sinyal proliferasi.⁴¹

Paparan sinar UVB menginduksi aktivasi faktor nuklir kappa B (NF-KB),

menginduksi sekresi berbagai mediator inflamasi termasuk : IL-1, IL-6, TGF- α dan VEGF. Pemblokiran NF-KB menghambat sekresi molekul-molekul ini. Kerusakan DNA akibat UVB bertanggung jawab atas aktivasi NF-KB, produksi TNF- β berkorelasi dengan jumlah kerusakan DNA.⁴¹ Stimulasi TGF- β memiliki fungsi biologis yang mendalam dalam mengatur pertumbuhan sel, diferensiasi, migrasi, respons imun/inflamasi, dan angiogenesis.⁴² Selama photoaging, produksi TGF- β yang berasal dari keratinosit menginduksi fotoinflamasi oleh MMP2, MMP9, dan rekrutmen neutrofil.⁴³

Sitokin pertama yang ditemukan IL-1, TNF- α , dan IL-6 diregulasi di kulit setelah radiasi sinar UV-B. Kemudian ditemukan bahwa keratinosit dan sel mast merupakan sumber TNF- β . Setelah diekspresikan, TNF- β memiliki efek pada berbagai tipe sel. Ini juga dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas I pada sel endotel dan fibroblas dermal yang dapat menginduksi produksi IL-1, meningkatkan ekspresi molekul adhesi, termasuk ICAM-1, VCAM-1 dan E-selectin dan menjadi pembentukan sel kulit terbakar. Meningkatkan regulasi molekul adhesi pada sel endotel, TNF- β membantu mendukung migrasi neutrofil dan makrofag ke kulit yang terpapar sinar UV.⁴¹

TGF- β dilepaskan ketika peptida terkait laten (LAP) terminal-N dibelah dari TGF- β 1 matang oleh sejumlah mediator termasuk MMP2/MMP9, ROS dan integrin. Fungsi utama pensinyalan TGF- β di kulit adalah menginduksi sintesis dan sekresi prokolagen tipe I melalui ekspresi gen faktor pertumbuhan jaringan ikat (CTGF) yang ditargetkan pada SBE. Selain itu, TGF- β menghambat ekspresi kolagen yang dimediasi MMP1 melalui jalur yang bergantung pada

Smad3. Pada penuaan kronologis, fibroblas dermal yang menua dengan ukuran/kekuatan mekanis yang berkurang menurunkan regulasi TGF- β RII, sehingga mengganggu jalur pensinyalan TGF- β /Smad.⁴³

2.3.3 Peran TGF- β pada hiperpigmentasi

TGF- β memainkan peran penting dalam proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel.⁶ Gangguan hiperpigmentasi pada kulit disebabkan oleh produksi dan akumulasi melanin yang berlebihan. Melanogenesis epidermal sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor parakrin yang berasal dari sel-sel tetangga yang distimulasi oleh UVB. TGF- β menghambat melanogenesis melalui pengurangan jalur pensinyalan MITF.⁶



Gambar 2. 4 Peran TGF- β menghambat melanogenesis.⁴⁴

Alur pensinyalan ERK memainkan peran penting dalam pensinyalan melanogenik, tergantung pada durasi dan intensitas aktivasi ERK, melanogenesis telah menunjukkan hasil yang kontradiktif. TGF- β menurunkan sintesis melanin melalui penurunan regulasi ekspresi mRNA MITF melalui aktivasi ERK. Pensinyalan ERK mengurangi sintesis melanin melalui degradasi MITF.⁶ TGF- β 1

adalah sitokin yang berperan dalam diferensiasi sel, proliferasi dan apoptosis, selain menghambat pigmentasi. TGF- β diyakini memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF- β 1 menghambat ekspresi gen homeotik kotak berpasangan (PAX 3), faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit. TGF- β 1 juga memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁴⁴

Melanosit merupakan sel penghasil pigmen pada epidermis folikel dan interfolikel, menghasilkan organel khusus yang berhubungan dengan lisosom yang disebut melanosom. Di dalam melanosom, biopolimer pigmen melanin disintesis untuk memberi warna pada rambut dan kulit, serta jaringan lain. Sintesis melanin ini melibatkan proses bipartit di mana protein struktural diekspor dari retikulum endoplasma dan menyatu dengan glikoprotein pengatur khusus melanosom yang dilepaskan dalam vesikel berlapis dari aparatus Golgi. Sintesis melanin terjadi setelah penyortiran dan pengangkutan protein ini ke melanosom.⁴⁴ Setiap melanosit berada di lapisan epitel basal dan, berdasarkan dendritnya, berinteraksi dengan sekitar 36 keratinosit untuk mentransfer melanosom dan melindungi kulit dari karsinogenesis yang diinduksi UV. Lebih jauh, jumlah dan jenis melanin yang diproduksi dan ditransfer ke keratinosit dengan penggabungan, agregasi, dan degradasi berikutnya memengaruhi warna kulit.^{37,44}

2.4 Beras hitam (*Oryza sativa* L. var *glutinosa*)

2.4.1 Klasifikasi tanaman beras hitam

Padi (*Oryza sativa* var.) merupakan tumbuhan musiman yang memiliki siklus hidup yang pendek bervariasi sekitar 110-130 hari. Tinggi tanaman padi pada umumnya sekitar 1-2 m, tergantung pada varietas dan kesuburan tanahnya. Karakter morfologi yang diamati dari batang, yaitu jumlah buku, jumlah ruas, panjang ruas, warna ruas batang, ketegaran batang, kerebahan dan sudut batang. Sebagian besar karakteristik pada batang menunjukkan keseragaman kecuali pada karakteristik panjang ruas, warna ruas, ketegaran batang, kerebahan dan sudut batang.⁴⁵

Dalam sistematika tumbuhan, beras hitam diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Monocotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Poales</i>
Famili	: <i>Poaceae</i>
Genus	: <i>Oryza</i>
Spesies	: <i>Oryza sativa</i> L. var <i>gkutinosa</i> .

Beras hitam adalah salah satu varietas dari padi yang merupakan tumbuhan semusim. Helai daun berbentuk garis dengan panjang 15 sampai 50 cm, kebanyakan dengan tepi kasar. Mempunyai malai dengan panjang 15 sampai 40 cm yang tumbuhan ke atas yang akhir ujungnya menggantung. Pada waktu masak, buahnya yang berwarna ada yang rontok dan ada yang rontok dan ada yang tidak.

Beras hitam merupakan salah satu varietas beras berpigmen yang telah lama dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia sebagai bahan makanan. Hal ini dikarenakan beras hitam sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif dan serat yang tinggi bagi kesehatan.



Gambar 2.5 Tanaman beras hitam.⁴⁶

Beras hitam mempunyai warna kehitaman, bila sudah dimasak warnanya benar-benar hitam pekat.⁴⁶ Beras hitam mengandung zat besi dan merupakan komponen antioksidan yang sangat bermanfaat untuk kulit, karena membantu mengaktifkan vitamin termasuk vitamin B1 yang dapat membantu menjaga kesehatan kulit, kekurangan magnesium dapat menyebabkan kulit kusam. Zat besi dan protein yang terkandung didalam beras hitam juga dapat membuat kulit tampak lebih cerah.¹⁶ Selain itu beras hitam diyakini mampu meningkatkan kolagen yang berfungsi untuk membantu menjaga kesehatan kulit, dan membuat kulit tampak lebih cerah.⁴⁷

Beras hitam selain bermanfaat untuk kesehatan juga memiliki manfaat bagi kecantikan kulit seperti melembabkan kulit, mencerahkan kulit, mengangkat sel kulit mati dan menggantikannya dengan sel kulit baru yang lebih sehat, mendinginkan kulit, membantu merawat peremajaan kulit, dan menghaluskan kulit.⁴⁸

2.4.2 Senyawa Bioaktif Beras Hitam

Beras hitam mempunyai memiliki kandungan amilosa masing masing sekitar 8,9 dan 9,7%. Didalam aleuron dan embrio terdapat protein, lemak, mineral dan beberapa vitamin. Sedangkan pada bagian endosperma hampir seluruhnya terdiri dari pati. Kandungan yang penting adalah antosianin yaitu suatu pigmen alami yang termasuk dalam keluarga besar flavonoid yang larut dalam air, yang bertanggung jawab memberikan warna merah, ungu, dan biru pada tanaman.⁴⁵ Ekstrak beras hitam memiliki kandungan total fenolik yang tinggi dan aktivitas sebagai peredam radikal bebas seperti beras merah. Sedangkan ekstrak bekatul beras putih menunjukkan kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan terendah.⁴⁹ Beras hitam kaya akan antosianin terutama *cyandin-3-O-β-D-glucoside* dan *peonidin 3- glucosida*. Beras hitam mengandung senyawa bioaktif seperti tokoferol, tokotrienol, oryzanol, antioksidan fenolik β-karoten dan antosianin.⁴⁹

Antosianin berperan dalam memberikan pigmen merah, biru, ungu hingga kehitaman pada beberapa bunga, buah, sayuran dan serelia. Beberapa sumber

antosianin terdapat pada buah mulberry, blueberry, cherry, blackberry, rosella, kulit dan sari anggur, strawberry dan lobak merah. Salah satu sumber antosianin yang juga merupakan sumber kekayaan alam di Indonesia selain sayuran adalah beras (*Oriza sativa*). Saat ini dikenal beberapa jenis beras yang kaya akan antosianin, seperti beras ketan hitam.¹⁶ Senyawa antosianin berfungsi sebagai antioksidan penangkap radikal bebas, sehingga berperan untuk mencegah terjadi penuaan, kanker dan penyakit degenerative.⁴⁹

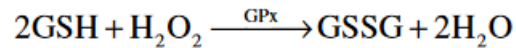
2.5 Mekanisme antioksidan dalam memperbaiki hiperpigmentasi

Penggunaan antioksidan baik secara topikal (krim atau serum) maupun sistemik (makanan kaya antioksidan atau suplemen) dapat menjadi strategi efektif untuk melindungi kulit dari efek buruk UVB dan mencegah hiperpigmentasi.⁵⁰ Paparan sinar UV kronis menyebabkan gangguan pigmentasi kulit dan berbagai tanda photoaging, seperti eritema, hiperkeratosis, solar lentigo, melasma, kerutan, dan kulit kendur. Mempertahankan homeostasis redoks seluler yang stabil sangat penting untuk mengurangi kerusakan akibat sinar UV pada tahap awal. Hal ini dicapai melalui jaringan antioksidan seluler, yang mencakup antioksidan enzimatis seperti katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPX) dan tioredoksin reduktase (TRX), serta antioksidan nonenzimatis seperti glutathione (GSH), vitamin C, dan vitamin E. Tripeptida GSH memainkan peran utama dalam membersihkan ROS, meregenerasi antioksidan lain, dan bertindak sebagai kofaktor dalam sistem GSH dan tioredoksin.⁵¹

Rasio GSH terhadap GSSG berfungsi sebagai indikator utama keadaan redoks seluler dan umumnya digunakan sebagai biomarker awal dan sensitif. Salah satu mekanisme pertahanan paling luar biasa terhadap kerusakan akibat sinar UV melibatkan peralihan metabolisme dari katabolisme glukosa ke jalur pentosa fosfat oksidatif, yang menghasilkan regenerasi GSH yang cepat dalam hitungan detik setelah paparan sinar UV. Meskipun mekanisme regenerasi ini cepat, kulit yang terpapar sinar matahari menunjukkan penurunan rasio GSH/GSSG, yang menunjukkan bahwa regenerasi akut GSH tidak memadai untuk mengkompensasi hilangnya GSH selama paparan sinar UV yang berkepanjangan. Pengisian kembali kadar GSH dari prekursor asam amino dapat menangkal peningkatan kadar ROS yang disebabkan oleh paparan sinar UV berulang. Selain perannya sebagai antioksidan, GSH juga berkontribusi secara signifikan terhadap melanogenesis dengan menghambat aktivitas tirosinase dan mengubah keseimbangan antara produksi eumelanin dan phaeomelanin.⁵¹

Glutathione Peroxidase (GPx) adalah sekelompok enzim yang bergantung pada selenium, dan terdiri dari sitosol, plasma, hidroperoksida fosfolipid, dan glutathione peroksidase gastrointestinal.⁵²

Antioksidan sekunder meliputi glutathion reduktase (GR) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PDH). G6PDH menghasilkan NADPH. GR diperlukan untuk mendaur ulang glutathion tereduksi (GSH) menggunakan enzim sekunder GR dan NADPH.⁵³



Antioksidan sekunder meliputi glutathione reduktase (GR) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PDH). G6PDH menghasilkan NADPH. GR diperlukan untuk mendaur ulang glutathione tereduksi (GSH) menggunakan enzim sekunder GR dan NADPH.



Glutathione adalah antioksidan jenis peptida yang mengandung sistein dan disintesis di dalam sel-sel tubuh. Kelompok tiol dalam bagian sisteinnya adalah agen pereduksi dan dapat dioksidasi dan direduksi secara reversibel. Glutathione dalam kadar tinggi ditemukan di dalam sel (~3.100 µg/g jaringan), dipertahankan dalam bentuk tereduksi (GSH) oleh enzim GR, dan pada gilirannya mereduksi metabolit dan sistem enzim lainnya, seperti askorbat. Karena konsentrasinya yang tinggi dan perannya dalam mempertahankan keadaan redoks di dalam sel, glutathione dianggap sebagai salah satu antioksidan seluler yang paling penting.⁵⁴

Antosianin, salah satu kelas flavonoid yang terdapat dalam berbagai buah, bunga, dan sayuran berwarna merah hingga ungu, dapat menurunkan reactive oxygen species (ROS) akibat paparan UVB melalui beberapa mekanisme kimia. Mekanisme ini melibatkan kemampuan antosianin sebagai antioksidan untuk mendonorkan elektron kepada ROS, sehingga menetralkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif.

Studi menunjukkan bahwa antosianin mengurangi efek merusak UVB

pada kulit dan sel, seperti stres oksidatif, inflamasi, dan kerusakan DNA. Aktivitas ini tidak hanya melibatkan peran langsung sebagai antioksidan tetapi juga regulasi jalur sinyal anti-inflamasi dan perbaikan DNA.^{55,56} Antosianin dengan struktur fenoliknya mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada ROS seperti superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($OH\cdot$), dan hidrogen peroksida (H_2O_2), menghasilkan molekul yang lebih stabil dan kurang reaktif.



Antosianin dapat berikatan dengan ion logam seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} yang memicu reaksi Fenton, sehingga mencegah pembentukan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Antosianin mencegah kerusakan membran sel akibat peroksidasi lipid yang dipicu oleh ROS.⁵⁵

Hidrogen peroksida adalah ROS non-radikal yang dapat menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Antosianin membantu mengurangi kadar H_2O_2 .

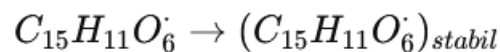


Antosianin mereduksi H_2O_2 menjadi air, sekaligus mengalami oksidasi ringan menjadi bentuk radikal stabil.

Antosianin dapat menyerap radiasi UVB secara langsung, mengurangi pembentukan ROS di kulit. Sifat kromofor antosianin memungkinkan absorbansi dalam rentang panjang gelombang UVB (280-320 nm), sehingga mengurangi pembentukan superoksida dan mencegah peroksidasi lipid pada membran sel. Antosianin juga memicu jalur sinyal redoks dalam tubuh,

seperti aktivasi Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), yang meningkatkan ekspresi enzim antioksidan:

Struktur antosianin terdiri dari cincin flavonoid dengan delokalisasi elektron tinggi. Ini memungkinkan radikal antosianin menjadi stabil setelah reaksi dengan ROS, sehingga mencegah propagasi radikal lebih lanjut.



Elektron tidak berpasangan terdelokalisasi di seluruh struktur cincin aromatik antosianin, menghasilkan radikal stabil yang tidak reaktif.^{55,56}

2.6 Mencit C57BL/6 model hiperpigmentasi

Mencit C57BL/6 adalah salah satu strain mencit yang paling banyak digunakan dalam penelitian biomedis, termasuk studi tentang hiperpigmentasi. Strain ini memiliki beberapa karakteristik yang menjadikannya model hewan yang ideal untuk berbagai jenis penelitian. Kelebihan penggunaan Mencit C57BL/6 yaitu Model biologis yang dipahami dengan baik, konsistensi genetik yang tinggi dan banyak digunakan dalam studi translasi.^{57,58} Karakteristik Umum Mencit C57BL/6 sebagai berikut:

a) Stabilitas Genetik:

C57BL/6 adalah strain inbred, artinya memiliki latar genetik yang seragam. Hal ini memungkinkan hasil penelitian menjadi lebih konsisten dan dapat diulang.

b) Respons Imun yang Baik:

Mencit ini memiliki sistem imun yang dipahami dengan baik, sehingga sering digunakan untuk penelitian imunologi, termasuk respons inflamasi

yang berkontribusi pada hiperpigmentasi post-inflamasi.

c) Produksi Melanin:

Bulu hitam pada mencit C57BL/6 disebabkan oleh aktivitas melanin tinggi, yang membuat mereka cocok untuk studi pigmentasi kulit.

d) Kesamaan Jalur Biologis:

Jalur melanogenesis pada mencit C57BL/6 mirip dengan manusia, sehingga data dari model ini lebih relevan untuk translasi klinis.

e) Respons terhadap Paparan UV:

Kulit mencit ini menghasilkan melanin sebagai respons terhadap radiasi UV, menjadikannya model yang baik untuk studi tentang efek sinar UV pada hiperpigmentasi.⁵⁸

Pemilihan Mencit C57BL/6 untuk penelitian hiperpigmentasi dibuat seperti kondisi klinis kondisi kulit manusia, digunakan untuk studi tentang melasma, hiperpigmentasi post-inflamasi, atau efek paparan sinar UV yang serupa dengan manusia. Respons terhadap Stimulus Melanogenesis pada mencit ini menunjukkan respons melanosit yang signifikan terhadap faktor eksternal seperti α -MSH, radiasi UV, atau stres oksidatif. Kesesuaian dengan Analisis Molekuler seperti alat molekuler (antibodi, primer untuk PCR, dll.) yang dirancang khusus untuk mencit, sehingga mempermudah analisis protein dan ekspresi gen yang terkait dengan melanogenesis. Relevansi dalam uji terapi dengan mencit C57BL/6 merupakan model yang baik untuk menguji efektivitas agen anti-hiperpigmentasi, seperti inhibitor tirosinase, antioksidan, atau bahan alami.⁵⁹

Studi pada mencit C57BL/6 sering dilakukan karena mencit ini memiliki latar genetik yang stabil dan respons pigmentasi kulit yang mirip dengan manusia. Mencit C57BL/6 sering digunakan karena memiliki kulit dan bulu hitam alami yang memungkinkan pengamatan perubahan melanin. Protokol Umum Penelitian pada Mencit C57BL/6

a) Perawatan dan Pemeliharaan:

Suhu: 22–26°C, Siklus terang/gelap: 12 jam terang, 12 jam gelap, Diet standar dan akses air ad libitum.

b) Induksi Hiperpigmentasi:

- Radiasi UVB: Digunakan untuk merangsang produksi melanin di kulit.
- Injeksi α -MSH: Merangsang melanosit untuk menghasilkan melanin.
- Stres oksidatif atau inflamasi: Model luka dapat digunakan untuk memicu hiperpigmentasi pasca-inflamasi.

c) Analisis Hasil:

- Histologi kulit: Untuk memeriksa perubahan struktur jaringan dan melanin.
- Spektrofotometri: Mengukur tingkat melanin.
- Analisis genetik dan protein: Untuk menilai jalur molekuler seperti *MITF*, *TYR*, dan *TRP*.

d) Etika Penelitian:

- Pastikan protokol penelitian telah disetujui oleh Komite Etika Penelitian Hewan.
- Minimalkan stres dan rasa sakit pada mencit selama prosedur.^{58,59}

2.7 Pengaruh pemberian ekstrak beras hitam terhadap kadar TNF- α dan TGF- β akibat dipapar sinar UV

Hiperpigmentasi terjadi akibat kulit terpapar sinar UV-B berlebih menyebabkan terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*.²⁹ Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami *photoaging* dapat berupa meningkatnya jumlah melanin.³⁰ Inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.³⁷ Melanogenesis melalui p53 memicu peningkatan ekspresi POMC untuk mensekresikan α -MSH yang mengatur ekspresi MITF, selanjutnya memicu enzim tyrosinase, Tyrp1 dan Tyrp2. Selain itu, radiasi UV-B meningkatkan produksi reaktif oksigen spesies (ROS) meningkatkan ROS dalam sel keratin dan melanosit, dan menyebabkan kerusakan DNA, mengaktifkan p53 lebih lanjut, dan dengan demikian memicu melanogenesis. TNF- α menghambat melanogenesis terutama melalui NF-KB dan mengurangi waktu paruh tyrosinase.⁹

TGF- β menurunkan sintesis melanin melalui penurunan regulasi ekspresi mRNA MITF melalui aktivasi ERK. Pensinyalan ERK mengurangi sintesis melanin melalui degradasi MITF.⁶ TGF- β memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tyrosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF- β 1 menghambat faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit, memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁴⁴

ROS sebagai penyebab stres oksidatif dapat bereaksi dengan molekul

seperti lipid, protein, atau asam nukleat, menyebabkan kerusakan pada membran sel dengan muatan positif di luar sel, dan muatan negatif di dalam sel, menyebabkan tidak seimbangannya tekanan osmotik sel, akhirnya menyebabkan kematian sel dan *fotoaging*.⁶⁰ Menggunakan jalur, penghambatan aktivitas oksida nitrat sintase, penghambatan aktivitas xantin oksidase, modifikasi jalur, atau interaksi dengan sistem enzim lain, flavonoid berfungsi sebagai antioksidan eksogen dan langsung dioksidasi oleh radikal untuk membentuk spesies yang kurang reaktif.⁶⁰

Jalur antioksidan memiliki sifat anti inflamasi, menghentikan pelepasan enzim pengurang reaksi inflamasi yang memodulasi ekspresi dan aktivasi sitokin, meliputi IL-1 β , TNF- α , IL-6, dan IL-8, mengatur ekspresi banyak molekul pro-inflamasi, termasuk faktor nuklir kappa-peningkat rantai cahaya sel B teraktivasi (NF- κ B), aktivator protein-1 (AP-1), molekul adhesi antar sel-1 (ICAM), adhesi sel vaskular molekul-1 (VCAM), dan E-selektin; juga menghambat enzim pro-inflamasi, seperti lipoksigenase, siklooksigenase-2, dan sintase oksida nitrat yang dapat diinduksi.⁶¹

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan ialah beras hitam yang memiliki kandungan antosianin sebagai antioksidan yang dapat memberi efek lembab dan memicu regenerasi sel baru.¹⁴ antosianin memiliki beraneka manfaat diantaranya sebagai antioksidan.⁴⁹

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

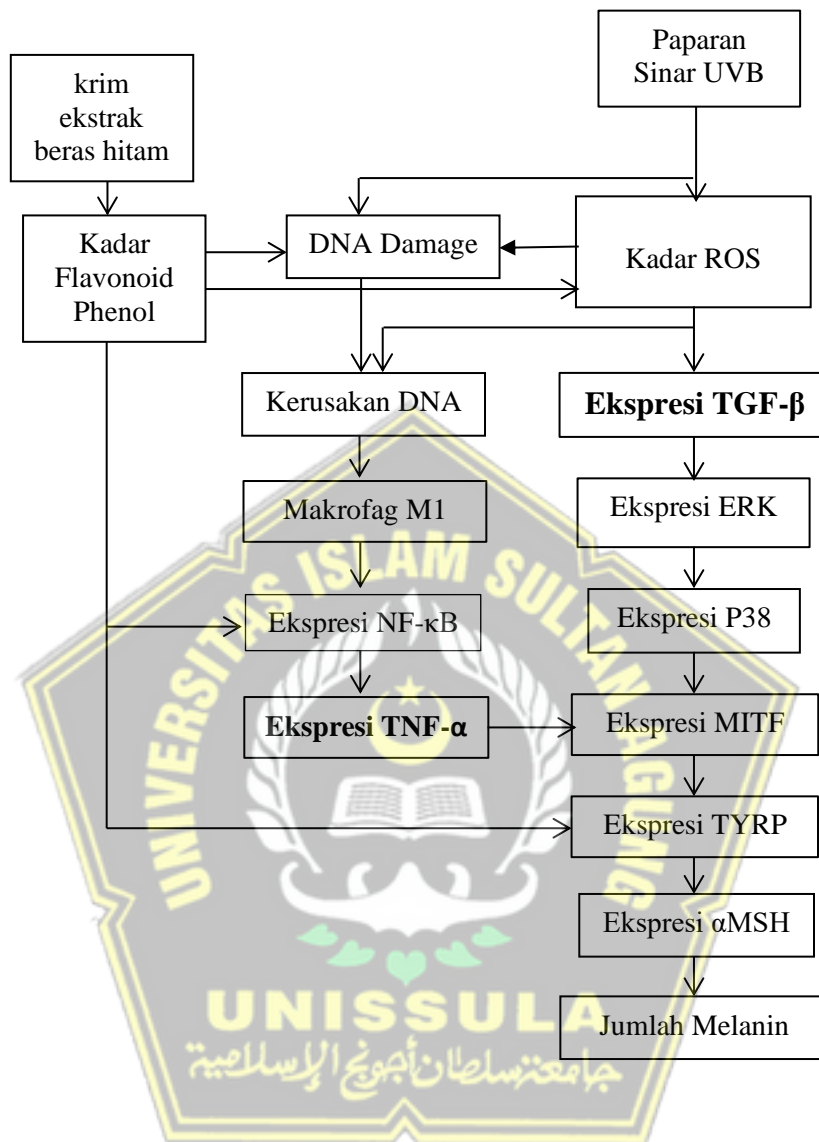
3.1 Kerangka teori

Radiasi UV merupakan spektrum cahaya yang memiliki panjang gelombang 280–320 nm.⁶² Paparan UV meningkatkan NADPH (*oksidase nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), menyebabkan DNA *demage*, meningkatkan kadar ROS, dan terjadinya inflamasi, sitokin, kemokin, maupun penuaan kulit. Inflamasi kronis yang disebabkan UV dapat melemahkan pertahanan kulit dan menurunkan serat kolagen dan elastin, dan juga menyebabkan penuaan dini.⁶³

Kerusakan yang disebabkan oleh peradangan pada keratinosit basal melepaskan sejumlah besar melanin. Pigmen bebas tersebut kemudian difagositosis oleh makrofag, yang sekarang disebut melanofag, di dermis atas dan menghasilkan tampilan kulit berwarna biru-abu-abu di lokasi cedera. Peningkatan ROS memicu Sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α pada kulit. TNF- α yang tinggi memicu kemotaksis sel inflamasi pada kulit.⁶⁴ Mekanisme respons inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.³⁷ Melanogenesis melalui p53 membantu mensekresikan α -MSH yang mengatur ekspresi MITF yang memicu enzim tyrosinase. Aktivasi jalur p38 MAPK yang terlibat pada fase stress oksidatif dan apoptosis yang diinduksi UVB, menyebabkan NF-kB bertranslokasi ke dalam nucleus, sehingga menginduksi aktivasi faktor transkripsi berbagai sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan mengakibatkan sintesis melanin.⁵¹

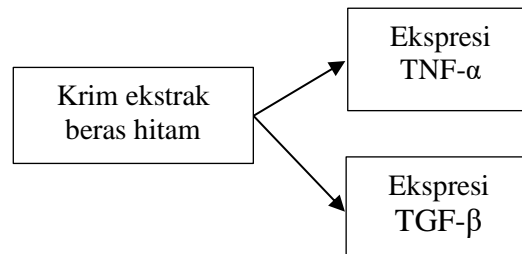
TGF- β menurunkan sintesis melanin melalui penurunan regulasi ekspresi mRNA MITF melalui aktivasi ERK. Pensinyalan ERK mengurangi sintesis melanin melalui degradasi MITF.⁶ TGF- β 1 adalah sitokin yang berperan dalam diferensiasi sel, proliferasi dan apoptosis, selain menghambat pigmentasi. TGF- β diyakini memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF- β 1 menghambat ekspresi gen homeotik kotak berpasangan (PAX 3), faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit. TGF- β 1 juga memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁴⁴

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan ialah beras hitam yang memiliki kandungan antosianin sebagai antioksidan dan antiinflamasi, memiliki aktivitas anti-karsinogenik, memperbaiki penglihatan, menginduksi apoptosis, dan efek neuroprotektif.¹⁴ Senyawa ekstrak beras hitam juga menghambat ekspresi STAT3, sehingga menghambat aktivasi NF- κ B yang dapat menekan pelepasan sitokin pro-inflamasi dan melanogenesis. Berdasarkan mekanisme diatas, maka dapat buat kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema kerangka teori

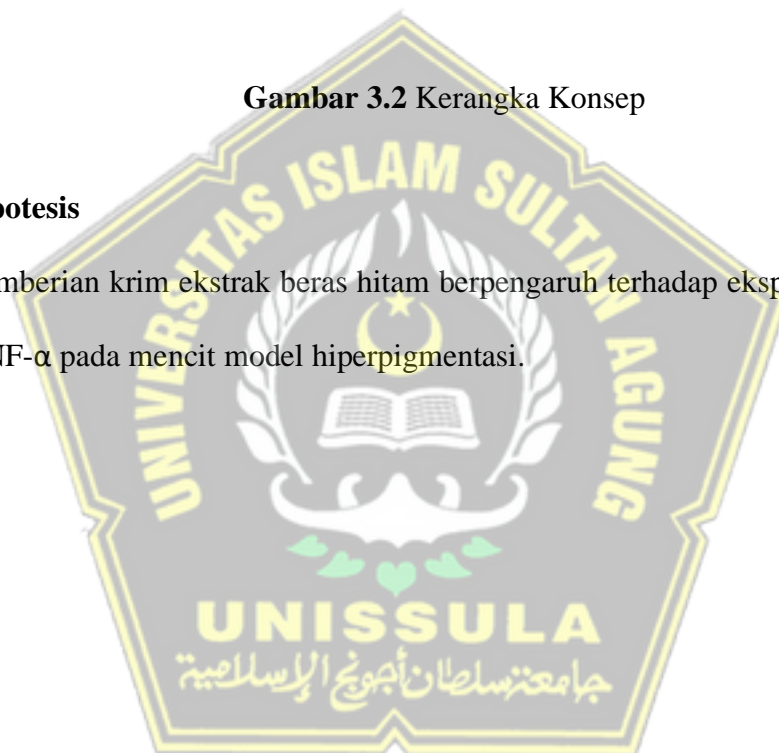
3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Pemberian krim ekstrak beras hitam berpengaruh terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi.



BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

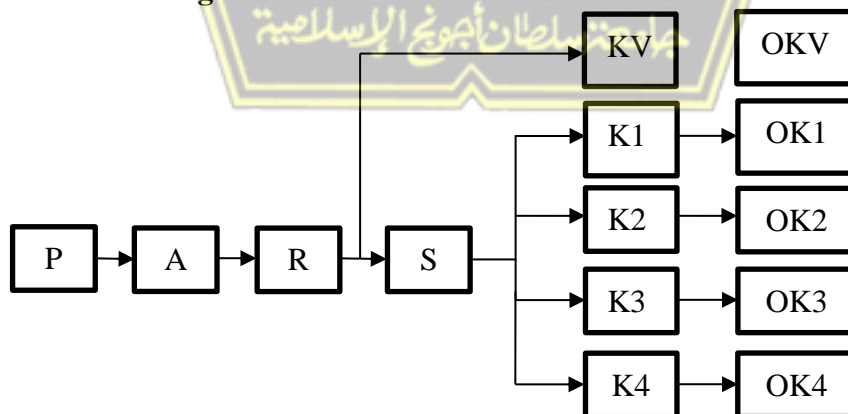
4.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian eksperimen dengan rancangan *post test only control group*. subjek penelitian adalah mencit C57BL/6 jantan dengan bobot badan 20-25 gr.

Kelompok perlakuan terdiri atas:

- a. K1 (Perlakuan Normal): Mencit sehat tanpa perlakuan,
- b. K2 (Kontrol negatif): Mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B dan diberikan basis krim/placebo,
- c. K3 (Perlakuan 1): Mencit model hiperpigmentasi dipapar sinar UV-B dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5%,
- d. K4 (Perlakuan 2): Mencit model hiperpigmentasi dipapar sinar UV-B dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 15%,

4.1.2 Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema Rancangan penelitian.

Keterangan:

- P = Populasi
 A = Adaptasi
 R = Randomisasi
 S = Sampel
 K1 = Kelompok sehat
 K2 = Kelompok negatif
 K3 = Perlakuan 1 dosis krim ekstrak beras hitam 7,5%
 K4 = Perlakuan 2 dosis krim ekstrak beras hitam 15%
 O = Observasi

4.1.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.1.3.1 Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek mencit C57BL/6 jantan yang berusia 6-8 minggu dengan bobot badan 20-25 gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian. Mencit menjalani adaptasi selama 7 hari, ditempatkan pada kandang terpisah dengan suhu tetap dan diberi pakan normal.

4.1.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit sehat yang mengalami hiperpigmentasi akibat dipapar sinar UVB selama 14 hari. Mencit yang mati atau mengalami infeksi selama perlakuan penelitian di *drop out*.

4.2 Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit C57BL/6 dengan masing-masing 5 ekor sampel per kelompok. Setiap kelompok akan ditambahkan 1 ekor mencit sebagai cadangan apabila ada

sampel yang drop out, dengan total keseluruhan berjumlah 24 ekor mencit. Tambahan satu ekor mencit tiap kelompok untuk dilakukan validasi model hiperpigmentasi sehingga total keseluruhan menjadi 28 ekor mencit.

4.3 Teknik Sampling Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan teknik *probability sampling* yaitu dengan cara pengambilan sampel dalam populasi tikus yang mempunyai kesempatan yang sama untuk di pilih menjadi sampel. Sistem yang digunakan yaitu pengambilan sampel secara acak yang sangat sederhana (*simple random sampling*). Semua mencit yang memenuhi kriteria untuk penelitian berjumlah 24 mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara random. Terdapat kelompok kontrol dan lainnya sebagai kelompok perlakuan. Ditambahkan 1 ekor untuk validasi sehingga total keseluruhan menjadi 28 ekor mencit.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% dan 15%.

2. Variabel Terikat

Ekspresi TGF- β dan TNF- α

3. Variabel Prekondisi

Paparan sinar UV-B

4.5 Definisi Operasional

4.5.1. Ekstrak beras hitam

Ekstrak beras hitam adalah ekstrak dari beras hitam yang didapat dari daerah di Boyolali, provinsi Jawa Tengah kemudian di proses melalui maserasi selama 72 jam, menggunakan pelarut etanol 70% dan evaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian ekstrak dibuat krim dengan komposisi basis (Olive oil, vaselin album, dimethicone, setil alkohol, isoprophyl myristate, Butylated hydroxytoluene (BHT), dan span-80) dengan dosis 7,5% dan 15% yang diberikan secara topikal 1 kali sehari pada bagian paparan sinar UV-B selama 14 hari di minggu 3 dan 4.

Hasil ukur mg dengan skala ordinal

4.5.2. Ekspresi TGF- β

Ekspresi TGF- β adalah jumlah ekspresi TGF- β yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel mencit setelah perlakuan pengolesan secara topikal selama 14 hari dengan krim ekstrak beras hitam setelah paparan UV-B. Jumlah ekspresi didapat dengan analisis menggunakan metode *Real-time Polymerase Chain Reaction* (RTq-PCR) dengan prosedur menyesuaikan sampel dari jaringan kulit secara lokal,

Hasil pengukuran dengan rasio TGF- β /GAPDH

4.5.3. Ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF- α adalah jumlah ekspresi TNF- α yang diekspresikan pada jaringan kulit sampel mencit setelah perlakuan pengolesan secara topikal selama 14 hari dengan krim ekstrak beras hitam setelah paparan UV-B. Jumlah

ekspresi dianalisis dengan metode RTq-PCR.

Hasil pengukuran dengan rasio TNF- α -SMA/GAPDH

4.6 Bahan atau Materi Penelitian

Pelitian ini menggunakan peralatan untuk membuat model mencit C57BL/6 hiperpigmentasi dipapar UVB 302mJ/cm² di dalam UV chamber Philips Actinic BL 6W, selama 10 menit, enam kali dalam dua minggu, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

Bahan yang digunakan terdiri dari ekstrak beras hitam, basis krim, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan tikus, dan chloroform.

4.7 Cara Penelitian dan Alur kerja

4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearence penelitian diajukan kepada komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak beras hitam

Sampel beras hitam sebanyak 2 kg dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Hasilnya dilakukan pemeriksaan kadar air dengan *moisture balance*, jika hasil kadar air dibawah 10% maka hasil pengeringan dianggap baik. Simplisia kemudian dilakukan sortasi, dipotong kecil-kecil

dan ditimbang. Lalu diblender menjadi serbuk. Kemudian diayak dengan ayakan ukuran 20 mesh. 500 gram serbuk simplisia beras hitam diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml. Serbuk simplisia beras hitam dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap secara terpisah. Kemudian simplisia direndam menggunakan pelarut etanol selama 5 hari dan sesekali dikocok 3 kali sehari, setelah 3 hari kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi ulang selama 2 hari dengan etanol 70% sebanyak 1250 ml. pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat yang terkumpulkan kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50° hingga diperoleh ekstrak kental.

4.7.3 Pembuatan sediaan krim ekstrak beras hitam

Pembuatan sediaan krim ekstrak etanol beras hitam dengan prosedur sebagai berikut:

Ditimbangan semua bahan masing masing sesuai tabel 4.1: bahan-bahan fase minyak yaitu asam stearat, setil alkohol, dan propil paraben dan fase air yaitu TEA, gliserin, metil paraben, dan aquades dipisahkan. Fase minyak dilebur diataswatebath dan fase air dilarutkan dengan air panas. Ekstrak beras hitam dilarutkan dalam sebagian aquades, lalu dimasukkan ke dalam fase air dan diaduk sampai homogen, kemudian dimasukkan fase minyak sedikit demi sedikit dan diaduk secara konstan hingga mencapai suhu kamar dan terbentuk basis krim kemudian tambahkan oleum rosae sebagai pewangi. Krim yang sudah jadi dimasukkan kedalam wadah krim.⁶⁵

Tabel 4.1. Komposisi Krim Ekstrak Beras Hitam.⁶⁵

Bahan	Krim dosis	Krim dosis
	7,5%	15%
Trietanolam (TEA)	3%	3%
Asam stearat	12%	12%
Setil Alkohol	4%	4%
Oleum rosae	Qs	Qs
Methyl paraben	0,2%	0,2%
Glyserin	30%	30%
Ekstrak beras hitam	7,5%	15%
Aqudest	Ad 50%	Ad 500%

4.7.4 Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan mencit C57BL/6 jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat 20-25 gram. Mencit ditempatkan pada ruangan bersuhu sekitar 28-32°C, dengan ruangan ventilasi yang cukup. Selama satu minggu mencit akan diadaptasi terlebih dahulu, diberi makanan pelet dan minum air putih secukupnya.

Sampel yang diambil secara random berasal dari 28 ekor mencit, yang dibagi menjadi 4 kelompok. Mencit tersebut dikandangkan dalam 4 kandang yang terdiri atas kelompok normal/sehat, kelompok mencit model hiperpigmentasi yang dipaparan UV-B tanpa perlakuan, kelompok mencit model hiperpigmentasi yang dipaparan UV-B dan diberikan secara topikal krim beras hitam 7,5%, dan kelompok mencit model hiperpigmentasi yang dipaparan UV-B dan diberikan secara topikal krim beras hitam 15% selama 14 hari perlakuan. Masing masing kandang berisi 5+1 ekor mencit dan disetiap kelompok ditambahkan 1 ekor untuk validasi model hiperpigmentasi.

4.7.5 Paparan UV-B pada mencit model Hiperpigmentasi dan Pemberian

Perlakuan

1. Mencit yang sudah diadaptasi selama 7 hari dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Bulu pada bagian punggung tikus di cukur dengan diameter 2 cm hingga bersih.
3. Pada punggung mencit didipapar UVB 302mJ/cm² di alam UV chamber selama 15 menit, 3 kali dalam seminggu, selama 2 minggu pertama.
4. Mencit perlakuan P1 dan P2 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan krim ekstrak beras hitam dengan dosis 7,5%, dan 15% yang diberikan satu kali sehari 4 jam setelah penyinaran UV-B.
5. Hewan model hiperpigmentasi dilakukan validasi peningkatan jumlah melanin pada hari ke-15 dengan pengecetan *Masson Fontana*.
6. Peningkatan jumlah melanin secara signifikan di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.⁶⁶

4.7.6 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Mencit dipilih secara random masing-masing 1 ekor dari tiap kelompok, 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 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.

4.7.7 Pengecekan Kadar Melanin Menggunakan Pengecatan Melanin

Jaringan kulit di potong secara membujur untuk pengamatan histologis secara lengkap. Pembuatan preparat jaringan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Jawa Tengah. Pengecatan melanin dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan *Masson Fontana* 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. Pengamatan dilakukan oleh spesialis patologi anatomi, Apabila terdapat peningkatan jumlah melanin secara signifikan di bandingkan kelompok sehat yang di tandai dengan munculnya warna kehitaman pada bagian epidermis.⁶⁶

4.7.8 Analisis Ekspresi TGF- β dan TNF- α Menggunakan Metode RTq-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁶⁷ 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 cyclers C1000 (Bio-Rad).
2. Penentuan ekspresi gen TGF- β dan TNF- α diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 μ L untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.
3. Perhitungan ekspresi gen ekspresi gen TGF- β dan TNF- α 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*.

4.7 Metode Analisis Data

Hasil data pada penelitian ini dilakukan uji statistik deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*, Hasil uji deskriptif Ekspresi TGF- β dan TNF- α yang diperoleh dilakukan uji parametrik uji beda uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Temhane* untuk mengetahui dosis yang paling berpengaruh. Keputusan untuk

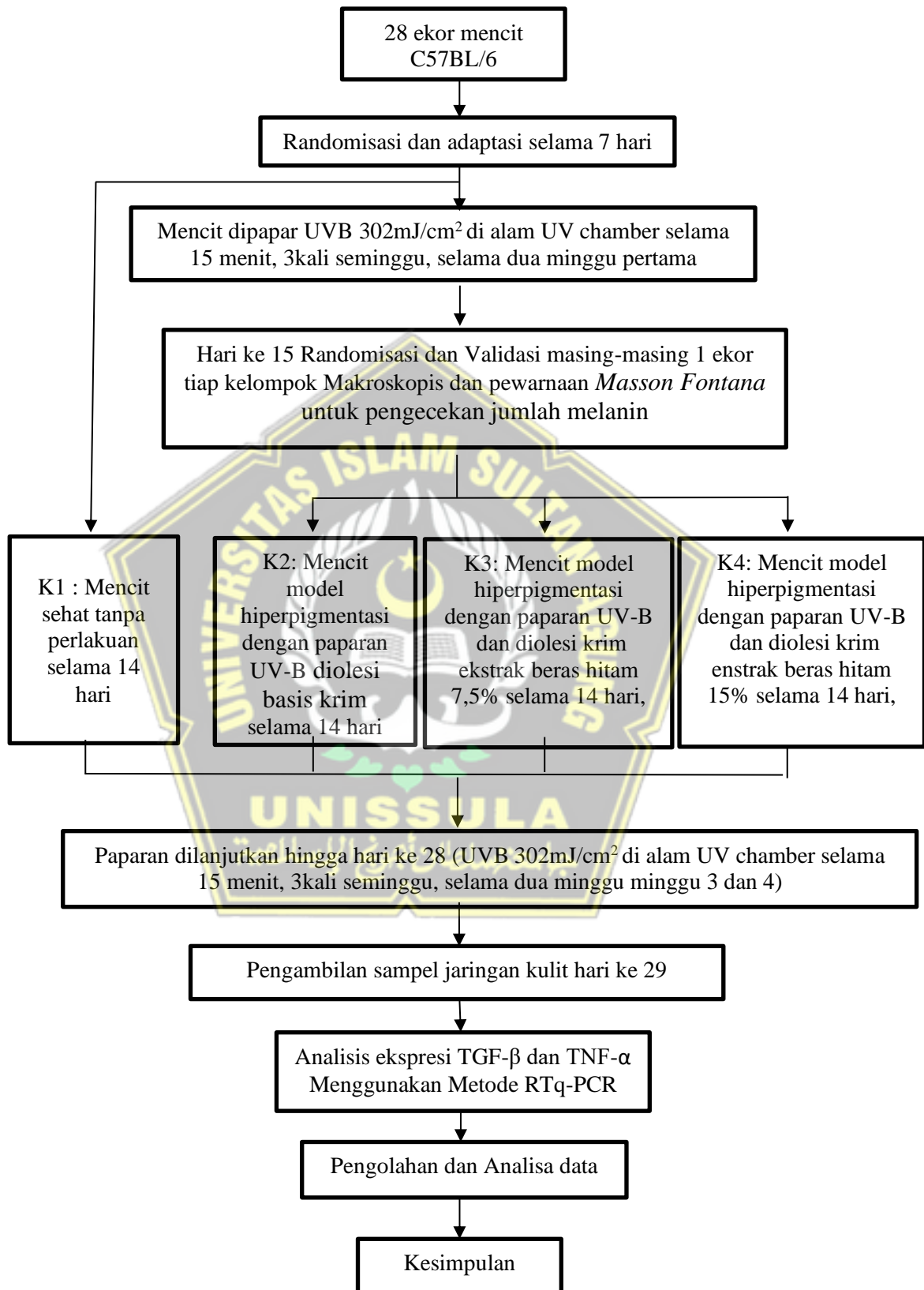
diterima atau ditolak berdasarkan α 5 % dan pengolahan analisis data dengan menggunakan SPSS.

4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium (SCCR) *Stem Cell and Cancer Research* Semarang Jawa Tengah dan dilakukan pada September-Oktober 2024.



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan riset eksperimen yang bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian krim beras hitam terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B, dilakukan di Laboratorium (SCCR) *Stem Cell and Cancer Research* Semarang. Sampel penelitian berjumlah 28 ekor mencit C57BL/6 yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok penelitian dibagi menjadi kelompok K1 (Perlakuan Normal) yaitu mencit sehat tanpa perlakuan, Kelompok K2 (Kontrol negatif) yaitu mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UV-B tanpa pemberian terapi, Kelompok K3 (Perlakuan 1) yaitu mencit model hiperpigmentasi dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5%, dan Kelompok K4 (Perlakuan 2) yaitu mencit model hiperpigmentasi dan diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 15%, perlakuan pada semua kelompok selama 14 hari dengan pemberian krim ekstrak beras hitam dengan merata secara topikal ke seluruh bagian kulit tikus yang terpapar sinar UVB.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Analisis Fitokimia Ekstrak Beras Hitam

Analisis ekstrak beras hitam diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol didapatkan karakteristik ekstrak beras hitam yang kental, dan berwarna coklat kehitaman. Hasil skrining fitokimia ekstrak beras hitam positif mengandung flavonoid dan phenol. Hasil analisis menggunakan metode spektrofotometri untuk penentuan total flavonoid didapatkan hasil sebesar 90,30 mg/100g \pm 4,02 dan mengandung total phenol 14,64 mg/100g \pm 0,40.

Penelitian oleh Fidrianny et al., 2016 melaporkan beras hitam memiliki kandungan fenolik yang lebih tinggi dari pada jenis beras lainnya. Total kandungan fenolik beras hitam dalam ekstrak etil asetat adalah 2,29 g GAE/100 g, dimana aktivitas DPPH tergolong sangat kuat. Hasil pada penelitian ini menunjukkan kadar antioksidan yang tinggi menggunakan ekstrak etanol pada ekstrak beras hitam, terbukti pada uji DPPH kadar antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 67,98 ppm ± 8,16. Kriteria penilaian aktivitas sangat tinggi IC₅₀ < 50 µg/mL, aktivitas tinggi IC₅₀ antara 50–100 µg/mL, aktivitas sedang: IC₅₀ antara 100–250 µg/mL, Aktivitas Rendah: IC₅₀ > 250 µg/mL.

Tabel 5.1 Hasil Analisis kandungan ekstrak beras hitam

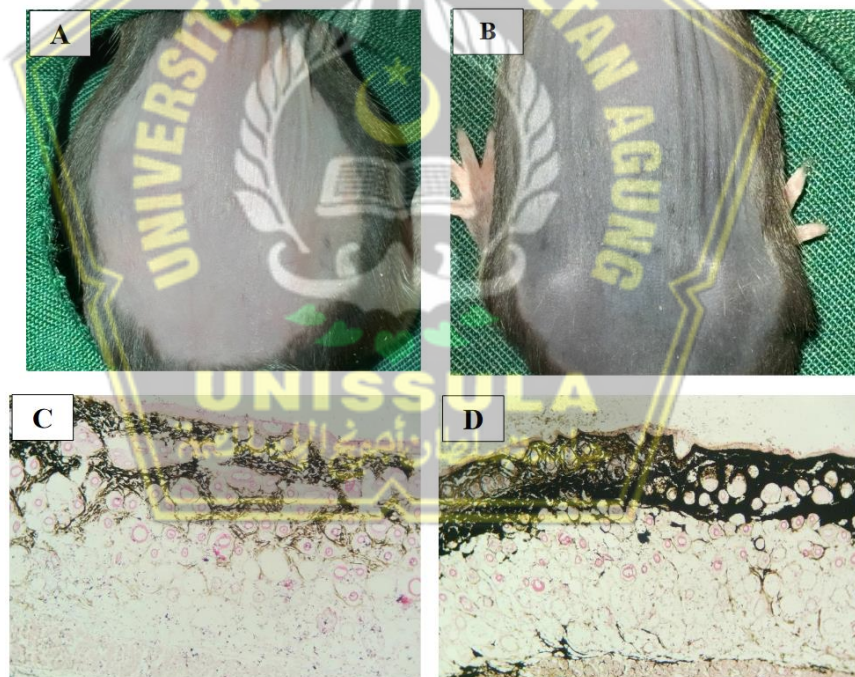
Parameter Uji	Metode	Hasil
Flavonoid Total	UV-Vis Spectrophotometry	90,30 ± 4,02
Phenolic Total	UV-Vis Spectrophotometry	14,64 ± 0,40
Antioksidan	DPPH Assay	67,98 ± 8,16.

5.1.2 Validasi Makroskopis dan Pewarnaan *Masson Fontana* Mencit Model Hiperpigmentasi.

Perlakuan subjek mencit model hiperpigmentasi dilakukan pada punggung mencit yang sudah di cukur dengan diameter 2 cm dan didipapar UVB 302mJ/cm² di dalam UV chamber selama 15 menit, enam kali dalam dua minggu dengan jarak lampu 20cm. Hari ke 15 setelah perlakuan mencit model hiperpigmentasi dilakukan validasi pembentukan melanin dengan pewarnaan *Masson Fontana* seperti pada gambar 5.1. mencit kelompok sehat warna kulit

masih normal (A), mencit yang disinari UVB terlihat jelas warna kulit sudah berwarna gelap (B), Melanin yang ditunjukkan dengan warna pink banyak terlihat pada mencit sehat (C), warna hitam lebih banyak pada mencit yang terpapar UVB atau mencit yang sudah mengalami hiperpigmentasi (D).

Paparan UVB menyebabkan kerusakan akibat peradangan pada keratinosit basal yang melepaskan sejumlah besar melanin. Akumulasi melanin yang berlebihan menyebabkan gangguan hiperpigmentasi pada kulit. Perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit berupa meningkatnya jumlah melanin seperti pada hasil analisis pewarnaan *Masson Fontana*.



Gambar 5.1 Makroskopis dan Morfologi kulit mencit tanpa paparan dan mencit yang dipapar UVB selama 14 hari.

Validasi hasil pewarnaan sampel kulit pada kelompok perlakuan UVB dengan pewarnaan *Masson fontana* menunjukkan hasil warna hitam pada bagian melanosit kulit. Sintesis melanin berlebihan menginduksi kerusakan kulit dan hiperpigmentasi.⁶⁸

5.1.3 Hasil Analisis pengaruh krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi TGF- β pada mencit model hiperpigmentasi

Hasil analisis ekspresi TGF- β pada kulit mencit dengan metode RTq-PCR pada hari ke 29 dan dilakukan analisis statistik uji normalitas data (*Shapiro wilk*) dan uji homogenitas data (*Levene's Test*) didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.2 Data hasil penelitian ekspresi TGF- β

Kelompok	Kontrol negatif (K2)	Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% (K3)	Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 15% (K4)	<i>p value</i>
Mean	0,55 ng/L	1,52 ng/L	1,87 ng/L	
SD	0,11	0,42	0,23	
<i>Shapiro wilk</i>	0,655*	0,444*	0,972*	
<i>Levene's Test</i>				0,000
<i>One way anova</i>				0,000*

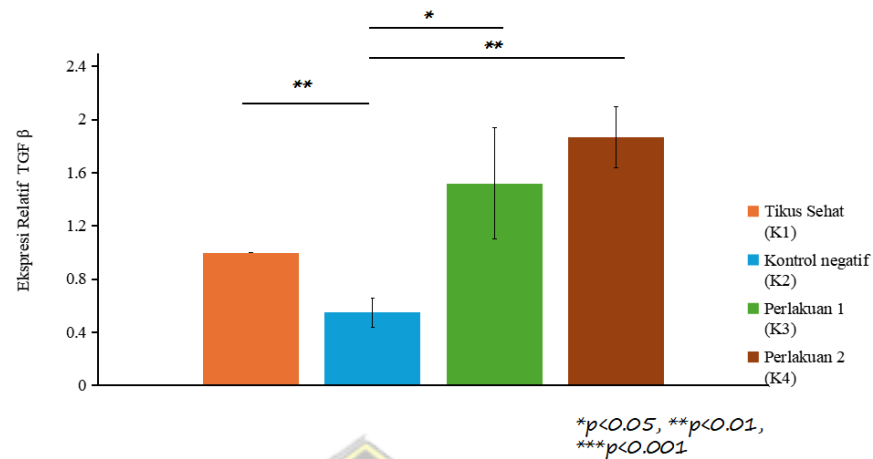
ngan:

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

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

**One way anova* ($p < 0,05$ = signifikan)

Hasil uji deskriptif rerata ekspresi TGF- β menunjukkan data terdistribusi normal dengan uji *Shapiro Wilk* dengan nilai $p > 0,05$ namun memiliki varian data yang tidak homogen dengan hasil uji *Levene's test* yaitu $p = 0,000$ ($p > 0,05$).



Gambar 5.2 Grafik rerata ekspresi TGF- β pada setiap kelompok

Rerata ekspresi gen TGF- β paling tinggi pada kelompok perlakuan 2 (K4) yang diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 15% sebesar 1,87ng/L \pm 0,23, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen TGF- β kelompok perlakuan 1 (K3) yang diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% sebesar 1,52 \pm 0,42. Ekspresi gen TGF- β pada kelompok kontrol negatif (K2) tanpa pemberian terapi sebesar 0,55 \pm 0,11 yang memiliki nilai lebih rendah dari kelompok perlakuan normal (K1) pada mencit sehat tanpa perlakuan, Hasil ini membuktikan paparan sinar UVB selama 14 hari menurunkan ekspresi gen TGF- β .

Berdasarkan hasil normalitas dan homogenitas data, dilakukan uji *one way anova* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh atau efek pemberian perlakuan tiap kelompok terhadap ekspresi gen TGF- β . Hasil uji *One way anova* menunjukkan hasil $p=0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi gen TGF- β antar

keempat kelompok (tabel 5.2), Kelompok perlakuan dosis 15% krim ekstrak beras hitam menunjukkan peningkatan paling signifikan terhadap ekspresi gen TGF- β .

Perbandingan rerata tiap kelompok dilakukan untuk menentukan kelompok yang paling berpengaruh terhadap ekspresi gen TGF- β dengan uji *post hoc tamhane* sebagai berikut:

Tabel 5.3 Uji *Post hoc tamhane* ekspresi TGF- β pada tiap kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Tikus sehat (K1)	K2	*0,001
	K3	0,164
	K4	*0,002
Kontrol negatif (K2)	K1	*0,001
	K3	*0,011
	K4	*0,000
Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% (K3)	K1	0,164
	K2	*0,011
	K4	0,513
Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 15% (K4)	K1	*0,002
	K2	*0,000
	K3	0,513

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Hasil perbandingan rerata antar kelompok perlakuan dengan data yang normal dan tidak homogen sehingga dilakukan uji *Post hoc tamhane* menunjukkan hasil kelompok mencit sehat (K1) berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok negatif (K2) $p = 0,001$ ($p < 0,05$), yang berarti kelompok negatif mengalami penurunan ekspresi gen TGF- β jika dibandingkan dengan kelompok sehat. Perbandingan kelompok mencit sehat (K1) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (K3) dengan dosis

7,5% krim ekstrak beras hitam memiliki nilai yang tidak signifikan $p = 0,164$ ($p < 0,05$), perlakuan dengan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% menunjukkan peningkatan ekspresi gen TGF- β jika dibandingkan dengan kelompok sehat namun tidak signifikan. Perbandingan kelompok mencit sehat (K1) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dengan krim ekstrak beras hitam dosis 15% memiliki nilai yang signifikan $p = 0,002$ ($p < 0,05$), perlakuan dengan krim ekstrak beras hitam dosis 15% meningkatkan ekspresi gen TGF- β secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok sehat. Berdasarkan hasil tersebut pemberian krim ekstrak beras hitam meningkatkan ekspresi gen TGF- β secara efektif pada dosis 15% pada mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

5.1.4 Hasil Analisis pengaruh krim ekstrak beras hitam terhadap ekspresi TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi

Hasil analisis ekspresi TNF- α pada kulit mencit dengan metode RTq-PCR pada hari ke 29 dan dilakukan analisis uji statistik normalitas data (*Shapiro wilk*) dan uji homogenitas data (*Levene's Test*) didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.4 Data hasil penelitian ekspresi TNF- α

Kelompok	Kontrol negatif (K2)	Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% (K3)	Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 15% (K4)	<i>p value</i>
Mean	8,27 pg/mL	5,40 pg/mL	1,93 pg/mL	
SD	4,25	2,28	1,02	
<i>Shapiro wilk</i>	0,287*	0,431*	0,574*	
<i>Levene's Test</i>				0,000
<i>One way anova</i>				0,000*

ngan :

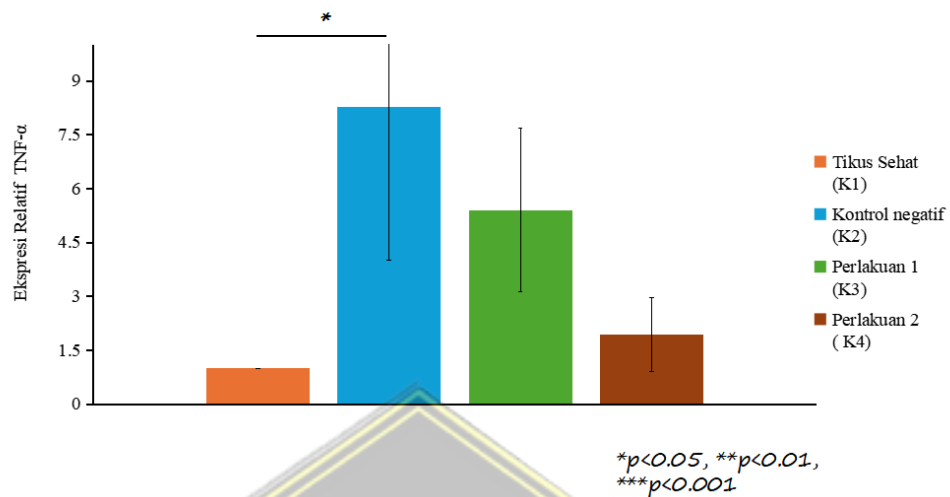
**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

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

**One way anova* ($p < 0,05$ = signifikan)

Hasil uji deskriptif rerata ekspresi TNF- α menunjukkan data terdistribusi normal dengan uji *Shapiro Wilk* dengan nilai $p > 0,05$ namun memiliki varian data yang tidak homogen dengan hasil uji *Levene's test* yaitu $p=0,000$ ($p > 0,05$).

Berdasarkan hasil normalitas dan homogenitas data, dilakukan uji *one way anova* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh atau efek pemberian perlakuan antar kelompok terhadap ekspresi gen TNF- α . Hasil uji *One way anova* menunjukkan hasil $p=0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi gen TNF- α antar kelompok (tabel 5.4), kelompok perlakuan krim ekstrak beras hitam dosis 15% menunjukkan penurunan paling signifikan terhadap ekspresi gen TNF- α .



Gambar 5.3 Grafik rerata ekspresi TNF- α pada setiap kelompok

Rerata ekspresi gen TNF- α paling tinggi pada kelompok kontrol negatif (K2) tanpa pemberian terapi sebesar $8,27 \pm 4,25$, menunjukkan paparan sinar UVB selama 14 hari meningkatkan ekspresi gen TNF- α , kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen TNF- α kelompok perlakuan 1 (K3) yang diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% sebesar $5,40 \pm 2,28$. Ekspresi gen TNF- α kelompok perlakuan 2 (K4) yang diberikan krim ekstrak beras hitam dosis 15% sebesar $1,92 \pm 1,02$, memiliki nilai lebih rendah dari kelompok kontrol negatif (K2) dan kelompok perlakuan 1 (K3). Hasil ini membuktikan bahwa pemberian krim ekstrak beras hitam menurunkan ekspresi gen TNF- α akibat paparan sinar UVB.

Perbandingan rerata tiap kelompok dilakukan untuk menentukan kelompok yang paling berpengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α dengan uji *post hoc tamhane* sebagai berikut:

Tabel 5.5 Uji *Post hoc tamhane* ekspresi TNF- α pada tiap kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Tikus sehat (K1)	K2	0,050
	K3	*0,031
	K4	0,373
Kontrol negatif (K2)	K1	0,050
	K3	0,705
	K4	0,079
Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% (K3)	K1	*0,031
	K2	0,705
	K4	0,068
Perlakuan 1 krim ekstrak beras hitam dosis 15% (K4)	K1	0,373
	K2	0,079
	K3	0,068

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Hasil perbandingan rerata antar kelompok perlakuan dengan Uji *Post Hoc tamhane* menunjukkan hasil kelompok mencit sehat (K1) tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok negatif (K2) $p=0,050$ ($p<0,05$), namun kelompok negatif mengalami kecenderungan peningkatan ekspresi gen TNF- α setelah dipapar sinar UVB. Perbandingan kelompok negatif (K2) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (K3) dengan krim ekstrak beras hitam dosis 7,5% memiliki nilai yang tidak signifikan $p =0,705$ ($p<0,05$), namun menunjukkan kecenderungan terjadinya penurunan ekspresi gen TNF- α setelah dipapar sinar UVB.

Perbandingan kelompok negatif (K2) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (K4) dengan krim ekstrak beras hitam dosis 15% memiliki nilai yang tidak signifikan $p=0,079$ ($p<0,05$), yang berarti kecenderungan terjadinya penurunan ekspresi gen TNF- α paling rendah

setelah dipapar sinar UVB. Dapat disimpulkan bahwa pemberian krim ekstrak beras hitam menurunkan ekspresi gen TNF- α secara efektif pada dosis 15% pada mencit model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB.

5.2 Pembahasan

Paparan UV-B secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu, mengakibatkan terjadinya melanogenesis.²⁹ Melanogenesis epidermal sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor parakrin yang berasal dari sel-sel tetangga yang distimulasi oleh UVB. Gangguan hiperpigmentasi pada kulit disebabkan oleh produksi dan akumulasi melanin yang berlebihan, perubahan mikroskopis yang terjadi berupa meningkatnya jumlah melanin.³⁰ Produksi berlebihan dan penumpukan melanin dapat menyebabkan bercak-bercak pigmentasi dan perubahan warna kulit, seperti kloasma, lentigo solar, dan bintik-bintik, yang menyebabkan masalah estetika.⁶⁹

Penelitian menggunakan *fermented unpolished black rice* (FUBR) menghasilkan pengurangan yang kuat dari kandungan melanin seluler dan aktivitas antioksidan. FUBR memiliki aktivitas antioksidan yang memiliki kemampuan untuk menurunkan tingkat ROS. Diketahui bahwa ROS merangsang produksi hormon perangsang alfa-melanosit dalam keratinosit dan mengikat reseptor melanokortin 1 pada sel melanoma yang menyebabkan melanogenesis. Selain itu, menghambat biosintesis melanin dengan merangsang fosforilasi ERK dan p38 yang menyebabkan degradasi MITF dan juga merangsang fosforilasi Akt yang menyebabkan pengurangan ekspresi MITF. Akibatnya, ekspresi gen hilir MITF termasuk TYRP1, TYRP2, dan gen tirosinase, berkurang.⁶⁹

Sejalan dengan hasil penelitian menggunakan krim ekstrak beras hitam terbukti mengandung flavonoid dan memiliki kandungan total fenolik yang tinggi.⁴⁹ Kandungan yang penting adalah antosianin yaitu suatu pigmen alami yang termasuk dalam keluarga besar flavonoid.⁴⁵ Ekstrak beras hitam memiliki kandungan total fenolik yang tinggi dan aktivitas sebagai peredam radikal bebas.⁴⁹ Beras hitam kaya akan antosianin terutama *cyanidin-3-O-β-D-glucoside* dan *peonidin 3- glucosida*. Beras hitam mengandung senyawa bioaktif seperti tokoferol, tokotrienol, oryzanol, antioksidan fenolik β-karoten dan antosianin.⁴⁹ Senyawa antosianin berfungsi sebagai antioksidan penangkap radikal bebas, sehingga berperan untuk mencegah terjadi penuaan.⁴⁹

Hasil analisis pemberian krim ekstrak beras hitam signifikan meningkatkan ekspresi gen TGF-β secara efektif pada dosis 15%, peningkatan ekspresi gen TGF-β lebih optimal pada dosis lebih besar. TGF-β menghambat melanogenesis melalui pengurangan jalur pensinyalan MITF.⁶ TGF-β menurunkan sintesis melanin melalui penurunan regulasi ekspresi mRNA MITF melalui aktivasi ERK. Pensinyalan ERK mengurangi sintesis melanin melalui degradasi MITF.⁶ TGF-β adalah sitokin yang berperan dalam diferensiasi sel, proliferasi dan apoptosis, selain menghambat pigmentasi. TGF-β diyakini memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF-β menghambat ekspresi gen homeotik kotak berpasangan (PAX 3), faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit. TGF-β juga memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁴⁴

Hasil analisis dengan pemberian krim ekstrak beras hitam menurunkan ekspresi gen TNF- α secara efektif pada dosis 15%. Paparan UVB meningkatkan sekresi TNF- α , memicu tyrosinase, selanjutnya terjadi aktivasi melanosit menghasilkan stimulasi pigmentasi epidermis.³⁶ Kerusakan yang disebabkan oleh peradangan pada keratinosit basal melepaskan sejumlah besar melanin. Pigmen bebas tersebut kemudian difagositosis oleh makrofag, yang sekarang disebut melanofag. Gangguan hiperpigmentasi, menyebabkan kondisi kulit fotosensitif yang diperburuk oleh paparan UV. Mekanisme respons inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.³⁷

Peradangan berkontribusi terhadap kerusakan lapisan basal epidermis dan bertindak sebagai pemicu bagi melanosit untuk melepaskan melanosom yang mengandung pigmen ke sel-sel kulit di sekitarnya, butiran pigmen dapat bertahan untuk waktu yang lama menyebabkan perubahan warna epidermis. Hal ini dapat memengaruhi epidermis, sitokin, kemokin, dan ROS yang dilepaskan selama peradangan sehingga merangsang pertumbuhan melanosit serta sintesis melanin dan pengangkutannya ke keratinosit di sekitarnya. Di antara faktor-faktor fisiologis yang mendorong terjadinya peristiwa ini salah satunya TNF- α . Pigmen biasanya meningkat di kompartemen basal epidermis, yang juga disertai dengan peningkatan ekspresi antibodi penanda melanoma (NKI/beteb) dan enzim metaloproteinase 2 (MMP-2).³⁷

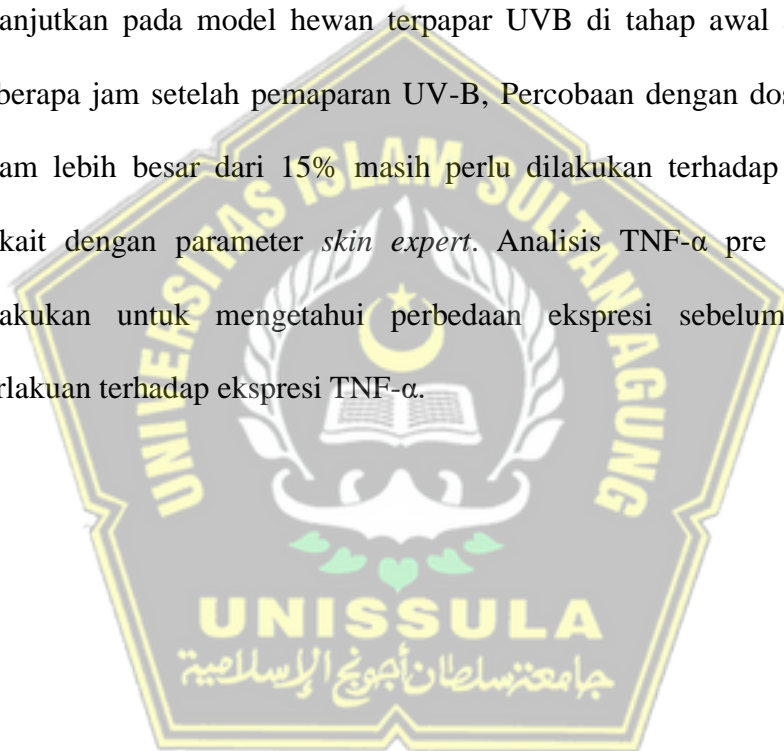
Paparan berlebih UVB menginduksi sitokin proinflamasi seperti produksi TNF- α oleh keratinosit, fibroblast dermal dan sel inflamasi lainnya. TNF- α merangsang pelepasan banyak sitokin dan kemokin,⁷⁰ menyebabkan kerusakan

pada DNA, kerusakan DNA pelepasan molekul inflamasi dari keratinosit epidermal termasuk TNF- α , dan dari fibroblas dermal menyebabkan peningkatan MMP.⁷¹ Paparan UVB meningkatkan sekresi TNF- α , memicu tyrosinase melalui pensinyalan intraseluler spesifik, diaktifkan setelah pengikatan endothelin-1 (EDN1) atau *stem cell factor* (SCF) terhadap masing-masing reseptor endothelin B (EDNRB) atau reseptor *stem cell growth factor*, yang dikenal sebagai proto-oncogen c-KIT (c-KIT), selanjutnya terjadi aktivasi melanosit menghasilkan stimulasi pigmentasi epidermis.³⁶

Penelitian ini menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α dengan pemberian krim ekstrak beras hitam. Terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi TNF- α , peningkatan kadar TNF- α dikaitkan dengan fungsi TNF- α mengaktifkan pensinyalan kompleks I menghasilkan transkripsi gen inflamasi (kemokin, sitokin) dan matriks katabolik (MMPs, ADAMTSs) bertugas memperbaiki sel yang rusak (*repair*) sehingga saat analisa kadar TNF- α terdeteksi meningkat.³⁵ Teori lain menyatakan tren peningkatan diduga akibat respon imun, tingginya tingkat apoptosis sel pada lingkungan inflamasi, ada pengaruh aktivitas sitokin *pleiotropic* yang memiliki efek spesifik pada interaksi antar sel, komunikasi antar sel, atau perilaku sel yang mempengaruhi hasil penelitian.⁷² Radiasi UVB dapat dengan cepat menginduksi ekspresi TNF- α pada keratinosit (KCs), fibroblas dermal dan sel mast, menyebabkan kaskade inflamasi pada kulit.⁷⁰

Penelitian ini membuktikan formulasi krim ekstrak beras hitam meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan menurunkan ekspresi gen TNF- α .

Keterbatasan dalam penelitian ini tidak melakukan ekstraksi menggunakan etil asetat yang diketahui kadungan antioksisannya sangat kuat dibandingkan dengan pelarut etanol yang kuat, kemudian tidak adanya kontrol negatif mencit yang dipapar UVB yang tidak diberikan intervensi. Validasi dengan menilai kadar melanin menggunakan protokol pengecatan *Masson Fontana*, namun tidak menganalisis derajat keparahan melanin. Penelitian masih perlu dilanjutkan pada model hewan terpapar UVB di tahap awal aktivasi TNF- α beberapa jam setelah pemaparan UV-B, Percobaan dengan dosis ekstrak beras hitam lebih besar dari 15% masih perlu dilakukan terhadap parameter lain terkait dengan parameter *skin expert*. Analisis TNF- α pre test juga perlu dilakukan untuk mengetahui perbedaan ekspresi sebelum dan sesudah perlakuan terhadap ekspresi TNF- α .



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Pemberian krim beras hitam dosis 15% berpengaruh signifikan terhadap ekspresi TGF- β pada mencit model hiperpigmentasi.
- b. Pemberian krim beras hitam dosis 15% berpengaruh signifikan terhadap ekspresi TNF- α pada mencit model hiperpigmentasi.

6.2. Saran

- a. Melakukan ekstraksi beras hitam menggunakan pelarut etil dan penambahan kelompok kontrol negatif mencit yang dipapar UVB yang tidak diberikan intervensi.
- b. Melakukan analisis terhadap derajat keparahan malanin dan analisis terhadap ekspresi gen TNF- α tahap awal aktivasi beberapa jam hingga hari ke 3 setelah pemaparan UV-B
- c. Melanjutkan penelitian dengan variasi dosis ekstrak beras hitam lebih dari 15% dengan parameter berbeda terkait dengan *skin expert*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(11):3427-3431. doi:10.1111/jocd.14033
2. Cristina Sitanggang T. JURNAL MEDIA SAINS 3 (2): 71-77 Krim Astaxanthin Mencegah Peningkatan Melanin Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B Astaxanthin Cream Prevents Increased Melanin in Guinea Pig Skin Exposed by Ultraviolet Light B. Published online 2019.
3. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936
4. Hossain MR, Ansary TM, Komine M, Ohtsuki M. Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083970
5. Shah H, Rawal Mahajan S. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomedicine and Aging Pathology*. 2013;3(3):161-169. doi:10.1016/j.biomag.2013.05.003
6. Moon HR, Jung JM, Kim SY, Song Y, Chang SE. TGF- β 3 suppresses melanogenesis in human melanocytes cocultured with UV-irradiated neighboring cells and human skin. *J Dermatol Sci*. 2020;99(2):100-108. doi:10.1016/j.jdermsci.2020.06.007
7. Zhou L, Shi YL, Li K, et al. Increased circulating Th17 cells and elevated serum levels of TGF-beta and IL-21 are correlated with human non-segmental vitiligo development. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(3):324-329. doi:10.1111/pcmr.12355
8. Owolabi JO, Fabiyi OS, Adelakin LA, Ekwerike MC. Effects of skin lightening cream agents - hydroquinone and kojic acid, on the skin of adult female experimental rats. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:283-289. doi:10.2147/CCID.S233185
9. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002
10. Riliani M, Pangkahila W, AAGP W. Pemberian Krim Ekstrak Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Mencegah Peningkatan Jumlah Melanin Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B (UVB). *Majalah Kesehatan Pharmamedika*. 2018;9(2). doi:10.33476/mkp.v9i2.678

11. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023;9(3). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13580
12. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(6):1000-1014. doi:10.1111/pcmr.12986
13. Rahmadari D, Anton A, Juliantoni. Analisis kandungan hidrokuinon dan merkuri dalam krim kecantikan yang beredar di Kecamatan Alas. *Spin Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia*, 3(1), 64-74. *SPIN*. 2021;3(1). doi:10.20414/spin.v3i1.3279
14. Hairiyah N, Nuryati N. APLIKASI BERAS KETAN HITAM (*Oryza sativa* var glutinosa) DAN MADU SEBAGAI BAHAN DASAR PEMBUATAN BODYSCRUB. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. 2020;24(2):114. doi:10.25077/jtpa.24.2.114-121.2020
15. Hagavane S, Sonawane S, Katkale A, Kunde V. Review on cream as topical drug delivery system. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* www.pharmacyjournal.in-2022. 2022;7(1):21-30.
16. Nisa K. Formulasi Sediaan Krim Lulur Dari Ekstrak Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* L. var glutinosa) Sebagai Pelembab Alami Kulit. *Skripsi*. Published online 2019:25-26.
17. 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(4). doi:10.5812/jjnpp.114152
18. Singh M, Mansuri MS, Kadam A, et al. Tumor Necrosis Factor-alpha affects melanocyte survival and melanin synthesis via multiple pathways in vitiligo. *Cytokine*. 2021;140(December 2020):155432. doi:10.1016/j.cyto.2021.155432
19. Wulandari MAM, Wiraguna AAGP, Pangkahila W. Peppermint Leaf Extract Cream Increased Transforming Growth Factor β (TGF- β) Expression and Collagen Amount In The Male Wistar Rat's Skin Exposed to UVB. *Jurnal Ilmiah Permas: Jurnal Ilmiah STIKES Kendal*. 2023;13(3):849-856. doi:10.32583/pskm.v13i3.1044
20. Kartini N, Denhara Wijaya C, Hidayat A. The Effect of Giving Black Rice Extract Ointment (*Oryza Sativa* L. Indica) on the Growth of Wistar Rat (*Rattus Novergicus*) Hair Follicles. *International Journal of Health and Pharmaceutical (IJHP)*. 2024;4(2):431-439. doi:10.51601/ijhp.v4i2.320
21. Daud NS, Daud NS, Ode L, Al Z. Formulasi lotion tabir surya ekstrak etanol beras merah (*Oryza nivara*). 1(September 2016):143-150.

22. Cavinato M, Koziel R, Romani N, et al. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2017;72(5):632-639. doi:10.1093/gerona/glw150
23. Wilianto, Linawati NM, Pangkahila W, Damayanti PAA, Trapika IGMGSC, Winarti NW. The Addition of Astaxanthin 0.5% in Sunscreen SPF 50 Inhibits the Increase of Sunburn Cells in Rats Induced By Ultraviolet Light B. *European Journal of Biomedical Research*. 2024;3(1):17-20. doi:10.24018/ejbiomed.2024.3.1.84
24. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
25. Ryser S, Schuppli M, Gauthier B, et al. UVB-induced skin inflammation and cutaneous tissue injury is dependent on the MHC class I-like protein, CD1d. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(1):192-202. doi:10.1038/jid.2013.300
26. Nobile V, Zanoletti V, Manzoni V, Romagnoli S, Cestone E. Soothing Effect of a Cosmetic Product on Skin Discomforts Induced by a Chemical Irritant (Capsaicin) and UV-Radiation, and after Mosquito Bites and Sunburn in a Real-World Setting. *Cosmetics*. 2022;9(6). doi:10.3390/cosmetics9060130
27. Nakamura M, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J. COX inhibition enhances inflammatory immune cell infiltration in UV-irradiated human skin: Implications for the treatment of sunburn. *Exp Dermatol*. 2015;24(10):734-735. doi:10.1111/exd.12783
28. Gallo RL, Bernard JJ. Innate immune sensors stimulate inflammatory and immunosuppressive responses to UVB radiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(6):1508-1511. doi:10.1038/jid.2014.32
29. Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol*. 2019;28(October 2018):23-27. doi:10.1111/exd.13818
30. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):1-14. doi:10.1101/cshperspect.a015370
31. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.010
32. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):1-16. doi:10.3390/ijms22052719
33. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and

- death balance of macrophages. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(May). doi:10.3389/fcell.2019.00091
34. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, Shapiro IM, Risbud M V. *Disc in Flames: Roles of TNF- α and IL-1 β in Intervertebral Disc Degeneration.*; 2016.
 35. Lee KJ, Park KH, Hahn JH. Alleviation of ultraviolet-B radiation-induced photoaging by a TNFR antagonistic peptide, TNFR2-SKE. *Mol Cells.* 2019;42(2):151-160. doi:10.14348/molcells.2018.0423
 36. Imokawa G, Ishida K. Inhibitors of intracellular signaling pathways that lead to stimulated epidermal pigmentation: Perspective of anti-pigmenting agents. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8293-8315. doi:10.3390/ijms15058293
 37. Markiewicz E, Karaman-Jurukovska N, Mammone T, Idowu OC. Post-Inflammatory Hyperpigmentation in Dark Skin: Molecular Mechanism and Skincare Implications. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022;15(November):2555-2565. doi:10.2147/CCID.S385162
 38. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus.* 2023;15(11). doi:10.7759/cureus.48840
 39. Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015;6(MAR). doi:10.3389/fphys.2015.00082
 40. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(1):47-63. doi:10.1002/wdev.86
 41. Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. Light, including ultraviolet. *J Autoimmun.* 2010;34(3). doi:10.1016/j.jaut.2009.11.011
 42. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019;50(4):924-940. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024
 43. Ke Y, Wang XJ. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology.* 2021;141(4):1104-1110. doi:10.1016/j.jid.2020.11.007
 44. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):4066-4087. doi:10.3390/ijms10094066
 45. Budiwati GAN, Kriswiyanti E, Astarini IA. Aspek Biologi Dan Hubungan Kekerabatan Padi Lokal (*Oryza sativa* L.) Di Desa Wongaya Gede Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan, Bali. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences.* 2020;6(2):277. doi:10.24843/metamorfosa.2019.v06.i02.p20
 46. Budianti MM. Pengaruh Variasi Konsentrasi Pati Prigelatinisasi Beras

- Hitam Organik Sebagai Gelling Agent Terhadap Sifat Fisik Sediaan Masker Peel Off Ekstrak Daun Bidara Published online 2021:2021. <https://digilib.uns.ac.id/dokumen/detail/98268/%0Ahttps://digilib.uns.ac.id/dokumen/download/98268/NTg2ODg5/Pengaruh-Variasi-Konsentrasi-Pati-Pragelatinisasi-Beras-Hitam-Organik-Sebagai-Gelling-Agent-Terhadap-Sifat-Fisik-Sediaan-Masker-Peel-Off-Ekstrak-Da>
47. Jamilatun M, Rahmadianty HA, Lukito PI. Quality Analysis Of Cream Scrub Combination of Moringa (Moringa oleifera) Leaf Extract and White Glutinous Rice (Oryza sativa glutinosa) Starch. *International Journal of Multidisciplinary Approach Research and Science*. 2023;1(03):302-311. doi:10.59653/ijmars.v1i03.167
 48. Risanti J. F. UJI STABILITAS FISIK DENGAN METODE CYCLING TEST SEDIAAN LOTION DARI AIR BERAS PUTIH (Oryza sativa L) DAN EKSTRAK KUNYIT (Curcuma domestica Val) DENGAN VARIASI KONSENTRASI TWEEN 80 DAN SPAN 80 SEBAGAI EMULGATOR (Doctoral dissertation , Politeknik Hara. (2022):2022.
 49. Itthivadhanapong P, Sangnark A. Effects of substitution of black glutinous rice flour for wheat flour on batter and cake properties. *Int Food Res J*. 2016;23(3):1190-1198.
 50. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *JKK*. 2017;4(1):39-48.
 51. Cui X, Mi T, Zhang H, et al. Glutathione amino acid precursors protect skin from UVB-induced damage and improve skin tone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2024;38(S3):12-20. doi:10.1111/jdv.19718
 52. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. Published online 2017:147-153.
 53. Ulasan S, Mahmood MN, Terapan DK, Terapan FS, Samarra U. Khasiat Glutathione dalam Mencerahkan Kulit : 2022;5(2):5-16.
 54. Nazhan Mahmood M. The Effectiveness of Glutathione on Skin Lightening: A Review. *Int J Med Sci*. 2022;5(2):2522-7386. <http://doi.org/10.32441.ijms.5.2.2>
 55. Jurnal J, Ipa P, Ilmu F, Islam U, Sunan N. Analysis of Total Anthocyanin Levels in Hibiscus (Hibiscus rosa-sinensis L .) Preparations by Differential pH Method Using UV-Vis Spectrophotometry Elsa Suryani *, Laili Nailul Muna. 2024;8(3):311-320.
 56. Iswanti W, Budijanto S, Abdullah M. Flavonoid and Antioxidant Activity Analysis of Anthocyanin Black Rice Bran Extract (Abribe) Cv Cempo Ireng Origin From Indonesia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food*

- Sciences*. 2024;14(2):1-6. doi:10.55251/jmbfs.10203
57. Curtis A, Calabro K, Galarneau JR, Bigio IJ, Krucker T. Temporal variations of skin pigmentation in C57Bl/6 mice affect optical bioluminescence quantitation. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(6):1114-1123. doi:10.1007/s11307-010-0440-8
 58. Kwon S, Sevick-Muraca EM. Effects of depilation-induced skin pigmentation and diet-induced fluorescence on in vivo fluorescence imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/7659242
 59. Curtis A, Calabro K, Galarneau JR, Bigio IJ, Krucker T. Temporal variations of skin pigmentation in C57Bl/6 mice affect optical bioluminescence quantitation. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(6):1114-1123. doi:10.1007/s11307-010-0440-8
 60. Ullah A, Munir S, Badshah SL, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. 2020;25(22). doi:10.3390/molecules25225243
 61. Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph B V., Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*. 2022;27(9). doi:10.3390/molecules27092901
 62. Mohania D, Chandel S, Kumar P, et al. Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 996. Springer New York LLC; 2017:71-87. doi:10.1007/978-3-319-56017-5_7
 63. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
 64. Sharma MR, Mitrani R, Werth VP. Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice. *J Photochem Photobiol B*. 2020;213. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112072
 65. Haque AF, Fauziah DW, Dayanie N. Formulasi dan Uji Iritasi Krim M/A dari Ekstrak Etanol Beras Hitam (*Oryza sativa* L. indica). *Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan*. 2019;5(1):53-58.
 66. Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, 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(A):1-7. doi:10.3889/oamjms.2022.10348
 67. Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, 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(6):755-764. doi:10.1111/wrr.12238
 68. Desai SR. Hyperpigmentation therapy: A review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2014;7(8):13-17.

69. 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(8):1184-1194. doi:10.4014/jmb.2003.03019
70. Sharma MR, Mitrani R, Werth VP. Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice. *J Photochem Photobiol B.* 2020;213. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112072
71. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
72. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Research.* 2022;71(7-8):817-831. doi:10.1007/s00011-022-01598-8
73. Prasetyo, Bayu & Purwono, Rini & Novarino, Alvin. (2021). Potensi Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa* L Indica) dan Penghambatan Tirosinase. *Jurnal Health Sains.* 2. 1132-111140. DOI:10.46799/jhs.v2i9.281

