

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM *Astaxanthin*
TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN TGF- β**

**Studi eksperimental *in vivo* pada kulit tikus wistar
terpapar sinar UVB akut**

TESIS

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



Magister Ilmu Biomedik

T. Erica Yunita Septiani

MBK.22.20.010335

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2025**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN KRIM *Astaxanthin* TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α

Studi eksperimental *in vivo* pada kulit tikus wistar
terpapar sinar UVB akut

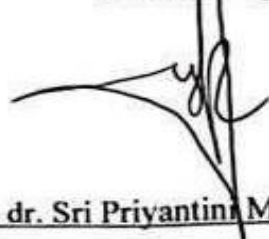
Disusun Oleh:

T. Erica Yunita Septiani

MBK.22.20.010335

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
14 Februari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui.

Pembimbing 1



Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp. A

NIK 210.105.097

Pembimbing 2



Dr. dr. Hadi Sarosa, M. Kes

NIK. 210.101.059

Mengetahui,

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



Dr. B. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS

NIK 210 113 160

PERNYATAAN

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

Semarang, 28 Februari 2025



METERAI
TEMPEL
63ALX413463418

(T. Erica Yunita Septiani)

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Pertama-tama penulis mengucapkan Alhamdulillahirrabbi lailamin pujisyukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan nikmat sehat dan keberkahanNya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan 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 *Astaxanthin* TERHADAP EKSPRESI TGF- β DAN TNF- α , Studi eksperimental *in vivo* pada kulit tikus wistar terpapar sinar UVB akut” selama penulisan 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.H.Setyo Trisnadi., SH, Sp.KF dan jajarannya selaku Dekan pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program Magister

Biomedik dan selaku penguji I.

3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FK. Unissula banyak memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam menyelesaikan tesis.
4. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp. A selaku pembimbing I yang telah berkenan membimbing penulis dan memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam penulisan tesis ini.
5. Dr. dr. Hadi Sarosa, M. Kes selaku pembimbing II yang telah berkenan membimbing penulis dan memberikan arahan dan saran yang konstruktif dalam penulisan tesis ini.
6. Dr. dr. Minidian Fasitasari, M. Sc, Sp.GK dan Dr. dr. Danis Pertiwi M.Si. Med,Sp.PK selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, arahan serta saran untuk perbaikan dalam tesis ini.
7. Semua pihak serta seluruh staf program Magister Biomedik FK. UNISSULA, staf Laboratorium IBL FK UNISSULA yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan tesis.

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

Semarang, 14 Desember 2024



T. Erica Yunita Septiani
MBK.22.20.010335

ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan sinar UV-B memicu sel inflamasi kulit dan meningkatkan sitokin pro-inflamasi, termasuk *Tumor Necrosis Factor Alpha* (*TNF- α*). Peningkatan *TNF- α* mengaktifasi *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) dan enzim perusak kulit lainnya, serta menurunkan ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (*TGF- β*), yang berujung pada kerusakan kolagen dan *photoaging*. Astaxanthin memiliki sifat anti-inflamasi, modulasi imun, dan aktivitas antioksidan yang kuat, sehingga berpotensi menjaga kesehatan kulit dan memperbaiki kerusakan akibat sinar UV-B. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian krim Astaxanthin terhadap ekspresi *TGF- β* dan *TNF- α* pada kulit yang terpapar sinar UV-B akut

Metode: Penelitian ini menggunakan desain *Post Test Only Control Group* dengan metode acak pada 28 ekor tikus Wistar yang dipapar sinar UV-B. Tikus dibagi dalam 4 kelompok: sehat (K1), negatif (K2), krim Astaxanthin 0,05% (K3), dan krim Astaxanthin 0,1% (K4). Analisis jaringan kulit menggunakan imunohistokimia, sedangkan uji statistik menggunakan *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*.

Hasil: Uji statistik menunjukkan perbedaan yang signifikan antar semua kelompok dalam ekspresi *TNF- α* dan *TGF- β* (nilai $p = 0,000$, $p < 0,05$). Ekspresi *TGF- β* paling rendah terdapat pada kelompok K4 (4,79%), diikuti K3 (6,57%), dan lebih tinggi pada kelompok K2 dengan *base cream* (7,53%), untuk ekspresi *TNF- α* , kelompok K4 juga menunjukkan hasil terendah (4,90%), diikuti K3 (5,93%), sedangkan kelompok K2 memiliki nilai tertinggi (7,06%).

Kesimpulan: Krim Astaxanthin menunjukkan pengaruh nyata terhadap ekspresi *TNF- α* dan *TGF- β* pada kulit yang terpapar sinar UV-B akut. Perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan menegaskan potensinya sebagai perlindungan kulit dari efek merusak sinar UV-B.

Kata Kunci: Krim *Astaxanthin*, ekspresi *TNF- α* dan *TGF- β* , UVB akut, *Photoaging*

ABSTRACT

Background: UV-B exposure triggers skin inflammatory cells and increases pro-inflammatory cytokines, including Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α). Increased TNF- α activates Matrix Metalloproteinases (MMPs) and other skin-damaging enzymes, and decreases the expression of Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), which leads to collagen damage and photoaging. Astaxanthin has strong anti-inflammatory, immune modulating, and antioxidant properties, so it has the potential to maintain skin health and repair damage caused by UV-B rays. This study aims to analyze the effect of Astaxanthin cream on TGF- β and TNF- α expression in skin exposed to acute UV-B rays

Methods: This study used a Post Test Only Control Group design with a randomized method on 28 Wistar rats exposed to UV-B rays. Mice were divided into 4 groups: healthy (group 1), negative (group 2), 0.05% Astaxanthin cream (group 3), and 0.1% Astaxanthin cream (group 4). Skin tissue analysis used immunohistochemistry, while statistical tests used Kruskal-Wallis and Mann-Whitney.

Results: Statistical tests showed significant differences between all groups in TNF- α and TGF- β expression (p value = 0.000, $p < 0.05$). The lowest TGF- β expression was in group K4 (4.79%), followed by K3 (6.57%), and higher in group K2 with base cream (7.53%), for TNF- α expression, group K4 also showed the lowest results (4.90%), followed by K3 (5.93%), while group K2 had the highest value (7.06%).

Conclusion: Astaxanthin cream showed a significant effect on TNF- α and TGF- β expression in skin exposed to acute UV-B light. The significant mean difference between the control and treatment groups confirms its potential as a skin protection against the damaging effects of UV-B rays.

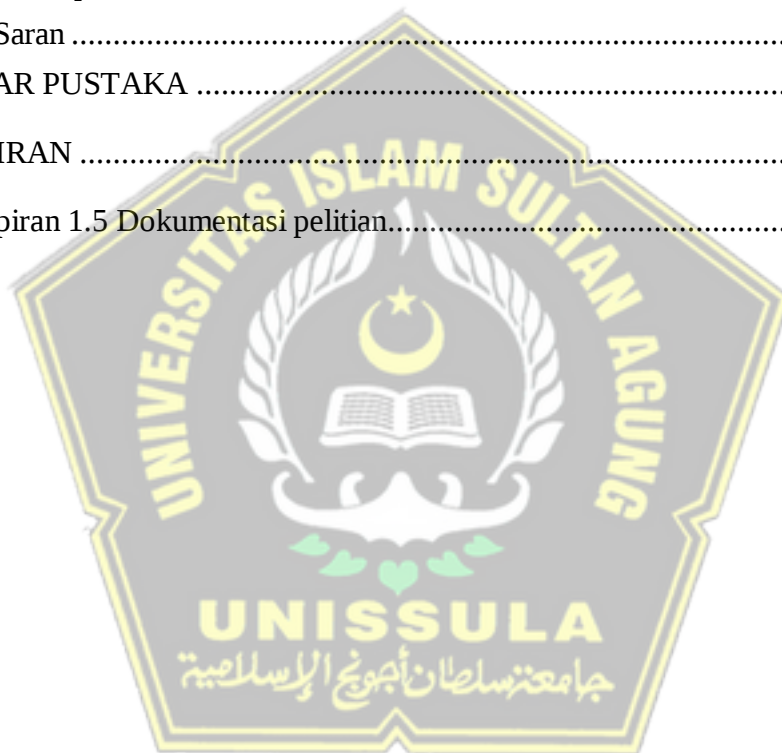
Keywords: Astaxanthin Cream, TNF- α and TGF- β expression, acute UVB, photoaging

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Orisinalitas penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	8
1.5.1 Manfaat Teoritis	8
1.5.2 Manfaat Praktis	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 TNF- α (Tumor necrosis factor alpha).....	10
2.1.1 Pengertian TNF- α	10
2.1.2 Pensinyalan TNF- α	12
2.1.3 Faktor yang mempengaruhi ekspresi TNF- α dan TGF- β	13

2.1.4 Pengukuran dengan metode IHC	14
2.2. TGF- β (Transforming growth factor beta)	16
2.2.1. Pengertian TGF- β	16
2.2.2. Pensinyalan TGF β	17
2.3 Sinar Ultraviolet B (UV-B).....	20
2.4 Astaxanthin	25
2.5 Mekanisme penetrasi krim pada kulit	29
2.6 Pengaruh Pemberian krim Astaxanthin terhadap kadar TGF- β dan TNF- α pada tikus yang dipapar sinar UVB	32
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN.....	35
3.1 Kerangka Teori	35
3.2 Kerangka Konsep.....	39
3.3 Hipotesis Penelitian	39
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	40
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	41
4.2.1 Populasi Penelitian	41
4.2.2 Sampel Penelitian.....	41
4.3 Besar Sampel.....	42
4.4 Variabel dan Definisi Operasional.....	42
4.4.1 Variabel Penelitian	42
4.4.2 Definisi Operasional.....	43
4.5 Waktu dan Tempat Penelitian	44
4.6 Alat dan Bahan	45
4.6.1 Alat	45
4.6.2 Bahan.....	45
4.7 Cara Penelitian.....	45
4.7.1 Perolehan Ethical Clearance	45
4.7.2 Pembuatan Sediaan Krim Astaxanthin	45
4.7.3 Pemaparan UVB dan Perlakuan pada Subjek Penelitian.....	46
4.7.4 Pengambilan Sampel Jaringan	47
4.7.5 Prosedur Analisa Menggunakan Metode Imunohistokimia	47
4.8 Analisa hasil	49
4.9 Waktu dan tempat penelitian	50

4.9 Alur Penelitian.....	51
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	52
5.1 Hasil Penelitian.....	52
5.1.1 Hasil histologi jaringan kulit dan gamabaran makaroskopis tiap kelompok perlakuan	53
5.1.2 Hasil analisis ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tiap kelompok perlakuan.....	58
5.2 Pembahasan	63
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	66
6.1. Kesimpulan.....	66
6.1. Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	74
Lampiran 1.5 Dokumentasi pelitian.....	80



DAFTAR SINGKATAN

BMP	: Bone morfogenik protein
COX	: Cyclooxygenase
DNA	: Deoxyribo nucleic acid
ECM	: Matriks ekstraseluler
GDF	: Growth differentiation factor
GDS	: Growth differentiation factor
GPx	: Glutathione peroksidase
IAP	: Inhibitor protein apoptosis
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule-1
IL-1	: Interleukin -1
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
LAP	: Leucine-rich repeats and PDZ domains
LTBPs	: Latent TGF- β Binding Protein
MAPK	: Mitogen activation protein kinase
MDA	: Malondialdehyde
MED	: Minimal Erythema dose
MMP	: Matriks metaloproteinase
NF- κ B	: Nuclear factor-kappa beta
PDGF	: Platelet-derived growth factor
RSSC	: Residual skin surface components
ROS	: Spesies oksigen reaktif
SC	: Stratum corneum

SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
SASP	: <i>Sekretori pro-inflamasi fenotipe</i>
STAT	: <i>Transducer and Activator of transcription</i>
TAK1	: <i>TGF-β-activated kinase 1</i>
TEWL	: <i>Transepidermal water loss</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VCAM	: <i>Vascular cell adhesion molecule</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Orisinalitas Penelitian	5
Tabel 5.1 Hasil uji normalitas dan homogenitas varian data	60
Tabel 5.2 Hasil rerata ekspresi TGF- β dengan uji <i>Kruskal Wallis</i>	61
Tabel 5.3 Hasil uji <i>Mann Whitney</i> ekspresi TGF- β	61
Tabel 5.4 Hasil uji rerata ekspresi TNF- α dengan uji <i>Kruskal Wallis</i>	62
Tabel 5.5 Hasil rerata ekspresi TNF- α dengan uji <i>Mann whitney</i>	62

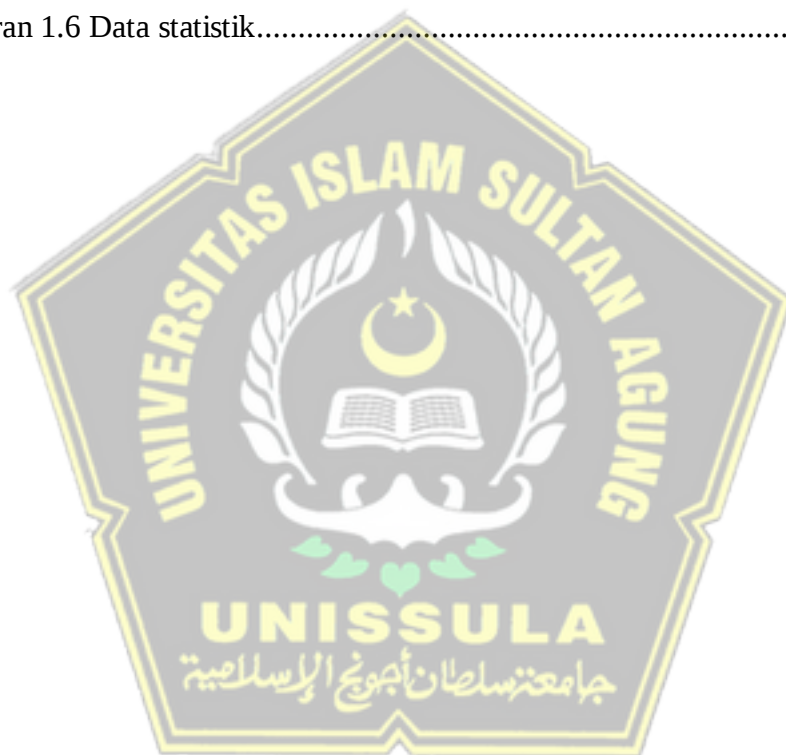


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur pensinyalan TNF- α	11
Gambar 2.2 Peran sinyal TGF- β dalam patogenesis photoaging.	18
Gambar 2.3 Mekanisme inflamasi akibat paparan UVB.....	21
Gambar 2.4 Mekanisme photoaging akibat paparan UV.	24
Gambar 3.1 Kerangka teori.....	38
Gambar 3.2 kerangka konsep	39
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	40
Gambar 4.2 Alur Penelitian,	51
Gambar 5.1 Imunohistopatologi ekspresi TGF- β	54
Gambar 5.2 Imunohistopatologi ekspresi TNF- α	57
Gambar 5.3 Makroskopis kulit tikus yang dipapar UVB selama 5 hari antar kelompok.....	58
Gambar 5.4 Rerata ekspresi TNF- α tiap kelompok	59
Gambar 5.5 Rerata ekspresi TGF- β tiap kelompok	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.1 <i>Ethical clearance</i>	74
Lampiran 1.2 Gambaran Histologis	75
Lampiran 1.3 Surat Keterangan penelitian	77
Lampiran 1.4 Hasil Pengamatan TGF- β dan TNF- α	78
Lampiran 1.5 Dokumentasi pelitian	80
Lampiran 1.6 Data statistik.....	82



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penuaan merupakan proses yang berlangsung secara alamiah pada setiap makhluk hidup yang dipengaruhi oleh berbagai faktor intrinsik maupun ekstrinsik. Paparan sinar matahari berlebihan merupakan faktor eksternal yang berdampak pada proses penuaan.^{1,2} Paparan UV-B memicu sel inflamasi pada kulit sehingga meningkatkan sitokin pro-inflamasi salah satunya *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α). Peningkatan ekspresi TNF- α mengaktifasi MMPs dan enzim lain yang dapat merusak kulit.³ Reaktif oksigen spesies (ROS) yang meningkat menyebabkan aktivasi *nuklir faktor kappa-beta* (NF- κ B) dan *activator protein-1* (AP1), serta menurunkan ekspresi *Transforming growth factor beta* (TGF- β), sehingga terjadi kerusakan kolagen yang menyebabkan *photoaging*.⁴Click or tap here to enter text. Pemakaian krim perawatan yang tidak tepat menyebabkan kulit kering, dan menjadi lebih sensitif sehingga meningkatkan risiko penuaan dini.⁶ Gejala klinis seperti kulit kering, hiperpigmentasi, kerutan, hingga adanya tumor prakanker.⁷ Pencegahan primer melalui penggunaan pelembab, tabir surya dan antioksidan.^{2,8}

Penggunaan *astaxanthin* telah dipelajari efeknya pada kesehatan kulit dengan hasil yang positif, Aktivitas antioksidannya 65 kali lebih kuat dibandingkan vitamin C, 54 kali lipat lebih kuat dari β -karoten dan 100 kali lebih kuat dari α -tokoferol.⁹ *Astaxanthin* terbukti memiliki sifat anti-inflamasi, memodulasi imun, dan secara terus menerus menghasilkan efek antioksidan yang kuat, mendorong kegunaannya untuk menjaga kesehatan dan mengatasi kerusakan kulit.¹⁰

Paparan sinar matahari menjadi penyebab 80% penuaan kulit, Radiasi UV-B meningkatkan kejadian kelainan kulit secara akut maupun kronis.⁷ Dalam 50 tahun terakhir, radiasi UV-B telah meningkat pesat, yang disebabkan oleh sejumlah faktor, penggunaan tabir surya dan anggapan bahwa tabir surya akan melindungi dari paparan sinar UV-B untuk jangka waktu yang lama, prevalensi aktivitas di luar ruangan, dan meningkatnya angka harapan hidup di negara-negara maju.¹¹ *Skin Cancer Foundation Statistic* melaporkan satu dari lima orang di Amerika beresiko tinggi mengalami kanker kulit. Kejadian kanker kulit mengalami peningkatan selama sepuluh tahun terakhir. Di Indonesia kejadian kanker kulit memiliki presentase sebesar 7%, penduduk Indonesia sebagian besar melakukan aktifitas diluar yang terpapar sinar matahari sehingga berisiko terkena kanker kulit.¹² Radiasi UV-B merangsang reseptor permukaan sel keratinosit dan fibroblas kulit sehingga menyebabkan kerusakan kolagen pada matriks ekstraseluler dan menghambat produksi kolagen baru selain kerusakan DNA langsung dan tidak langsung.¹³ Konsumen akan mencari alternatif terapi yang dapat meningkatkan penampilan dan mengurangi tanda-tanda penuaan seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi serta meningkatnya harapan hidup.^{14,15}

Astaxanthin mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat, formula yang mempunyai aktivitas antioksidan terbaik adalah formula 5% dengan IC₅₀ 87,571ppm. Hasil uji fisik, kimia, uji stabilitas selama penyimpanan 28 hari sediaan lotion *astaxanthin* memenuhi syarat. Sedangkan uji kelembaban menunjukkan sediaan lotion *astaxanthin* yang mempunyai persentase peningkatan kelembaban tertinggi pada dosis 5%.¹⁶ Sejalan dengan hasil tersebut, *astaxanthin* dalam

formulasi krim tabir surya secara signifikan meningkatkan nilai SPF pada semua kondisi penyimpanan, studi ini menunjukkan bahwa *astaxanthin* adalah filter UV alami yang sangat baik yang dapat meningkatkan kemanjuran tabir surya dan stabil pada suhu kamar (25 °C) dengan SPF yang lebih tinggi dan tidak ada perubahan pH dan viskositas yang signifikan. Hasilnya *astaxanthin* akan bermanfaat bagi industri kosmetik dan memberikan alternatif krim tabir surya alami.¹⁷

Penuaan yang terjadi akibat UV menyebabkan gangguan pada kolagen dermal, elastin dan *Matriks ekstraseluler* (ECM), hilangnya integritas struktural pada dermis, meningkatkan jumlah dan tingkat keparahan kerutan dan memburuknya tekstur kulit.¹⁸ Peran sentral ROS pada tingkat molekuler menghasilkan produksi *Matriks metaloproteinase* (MMP) dan sitokin proinflamasi. MMP yang diinduksi UV memulai pembelahan kolagen fibrin (tipe I dan III pada kulit), sehingga mengganggu integritas struktural dermis. UV menyebabkan kerusakan kumulatif pada kolagen, sintesis kolagen menurunkan ekspresi gen prokolagen tipe I dan III (induksi AP-1 dan *downregulasi* TGF- β).¹⁹ Paparan radiasi UV terus-menerus pada kulit akan menghasilkan berbagai sitokin dari melanosit dan keratinosit di epidermis dan dari fibroblas, sel endotel, sel mast, dan sel inflamasi lainnya di dermis. Dari semua sitokin ini, terjadi peningkatan signifikan pada kadar TNF- α .²⁰ Penurunan ketahanan tubuh untuk melawan stres oksidatif, aktivasi jalur *Nuclear factor-kappa beta* (NF- κ B) dan *Mitogen activation protein kinase* (MAPK), penurunan reseptor faktor pertumbuhan TGF- β .²⁰ Perlunya produk yang memberikan perlindungan dari peningkatan ROS yang meningkatkan produksi kolagen, mengurangi degradasi kolagen dan perubahan pigmentasi.²¹

Antioksidan alami memiliki kemampuan untuk memberikan efek fotoprotektif dengan menyerap energi UV dan mengurangi pembentukan radikal bebas yang dihasilkan oleh reaksi oksidasi yang diinduksi UV. Bahan alami yang berasal dari alam, seperti *Astaxanthin* dianggap sebagai sumber tabir surya yang potensial karena daya serap sinar UV yang tinggi dan aktivitas antioksidannya. *Astaxanthin* termasuk dalam famili *Astaxanthin Xantofil*, turunan karotenoid teroksigenasi yang disintesis secara alami oleh bakteri, mikroalga, dan ragi.¹⁷ *Astaxanthin* banyak digunakan dalam nutraceuticals, kosmetik, makanan dan akuakultur industri karena manfaat kesehatannya berupa bioaktivitas seperti antioksidan, anti-inflamasi dan antimikroba.²² Diharapkan dengan pemberian krim *Astaxanthin* secara topikal dapat menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan kadar TGF- β , karena penggunaan sediaan krim memiliki konsistensi yang lebih kental dengan persentase air yang lebih sedikit, dan mudah untuk meresap ke dalam kulit.²³ Namun masih sedikit laporan terkait pengaruh pemberian krim *astaxanthin* terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada jaringan kulit tikus wistar akibat paparan sinar UV-B akut, sehingga perlu dilakukan penelitian.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian krim *Astaxanthin* terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada jaringan kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian krim *Astaxanthin* terhadap ekspresi

TGF- β dan TNF- α pada kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut?

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar yang tidak terpapar sinar UV-B akut.
- b. Untuk mengetahui rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut dan diberikan basis krim
- c. Untuk mengetahui rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut dan diberikan krim *Astaxanthin* 0,05%
- d. Untuk mengetahui rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut dan diberikan krim *Astaxanthin* 0,1%
- e. Menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α antar kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan

1.4 Orisinalitas penelitian

Tabel 1.1 Orisinalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
----------	------------------	--------	------------------

Wilianto, Linawati NM, Pangkahila W, Damayanti PAA, Trapika IGMGSC, Winarti NW. ²⁴	<i>The Addition of Astaxanthin 0.5% in Sunscreen SPF 50 Inhibits the Increase of Sunburn Cells in Rats Induced By Ultraviolet Light B.</i>	Eksperimental In Vivo	Astaxanthin 0,5% yang ditambahkan pada produk tabir surya SPF 50 dapat menghambat peningkatan sel kulit terbakar sinar matahari. ²⁴
Setyanto B, Murlistyarini S, Florensia D. ²⁵	<i>Effectiveness of 0.1% Retinol Serum and Astaxanthin Gel on Skin Photoaging</i>	Eksperimental In Vivo	Astaxanthin dan retinol 0,1% dapat digunakan sebagai terapi photoaging. ²⁵
Zakaria NNA, Zamzurie NA, Harith ZT. ¹⁷	<i>Evaluation of sunscreen cream incorporated with astaxanthin from Haematococcus pluvialis in different storage conditions.</i>	Eksperimental In Vitro.	Astaxanthin dapat meningkatkan kemanjuran tabir surya dan stabil pada suhu kamar (25 °C) dengan SPF yang lebih tinggi dan tidak ada perubahan pH dan viskositas yang signifikan.
Suganuma K, Nakajima H, Ohtsuki M, Imokawa G. ²⁶	<i>Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts.</i>	Eksperimental In Vivo.	Astaxanthin memberikan manfaat dalam melindungi kulit dari penuaan akibat sinar UVA seperti kulit kendur dan keriput.
Chalyk NE, Klochkov VA, Bandaletov a TY, Kyle NH, Petyaev IM. ²⁷	<i>Continuous astaxanthin intake reduces oxidative stress and reverses age-related morphological changes of residual skin surface components in middle-aged</i>	Eksperimental In Vivo.	Pemberian astaxanthin menunjukkan deskuamasi korneosit yang lebih rendah dan penurunan keberadaan penurunan MDA plasma (pengurangan 11,2% pada hari ke 15 dan 21,7% pada hari ke 29). Terjadi peralihan usia kulit ke arah tampilan yang lebih muda pada individu yang diberikan astaxanthin, karena tindakan antioksidannya yang menyebabkan

	volunteers.		peremajaan kulit wajah.
Ito N, Seki S, Ueda F. ²⁸	<i>The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.</i>	Eksperimental In Vivo	Astaxanthin menunjukkan peningkatan MED dibandingkan dengan plasebo, mengalami penurunan kehilangan kelembapan kulit di area yang diiradiasi dibandingkan dengan plasebo. perbaikan kulit kasar di area non-iradiasi secara signifikan dengan astaxanthin. Astaxanthin melindungi kerusakan kulit akibat sinar UV dan membantu menjaga kesehatan kulit pada orang sehat.
Nurdianti L, Asriana Sari D, Yulianti R. ¹⁶	<i>Continuous astaxanthin intake reduces oxidative stress and reverses age-related morphological changes of residual skin surface components in middle-aged volunteers</i>	Eksperimental In Vitro.	Hasil uji fisik, kimia, uji stabilitas selama penyimpanan 28 hari sediaan lotion astaxanthin menunjukkan Formula 1 (1%), Formula 2 (3%) dan Formula 3 (5%) memenuhi syarat. Sedangkan uji kelembaban menunjukkan sediaan lotion astaxanthin yang mempunyai persentase peningkatan kelembaban tertinggi adalah Formula 3.
Sitanggang TC.2019. ²⁹	Krim Astaxanthin Mencegah Peningkatan Melanin Kulit Marmut (<i>Cavia porcellus</i>) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B.	Eksperimental In Vivo.	Krim astaxanthin 0,02% dapat mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut yang dipapar sinar UVB dengan efektivitas menyamai krim hidrokuinon 4%.

Penelitian ini memiliki perbedaan signifikan dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dalam beberapa aspek penting. Secara khusus, penelitian ini menganalisis pengaruh krim Astaxanthin terhadap ekspresi *TGF-β* dan *TNF-α* pada kulit tikus Wistar yang terpapar sinar UV-B akut. Sementara itu, penelitian sebelumnya lebih banyak berfokus pada efek Astaxanthin terhadap sel kulit terbakar, penuaan kulit (*photoaging*), peningkatan *Sun Protection Factor* (SPF)

pada tabir surya, pengurangan stres oksidatif, dan pencegahan peningkatan melanin. Dari segi metode dan subjek penelitian, penelitian ini menggunakan model *in vivo* dengan tikus Wistar yang dipapar sinar UV-B akut serta menganalisis ekspresi *TGF-β* dan *TNF-α* menggunakan metode imunohistokimia. Berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan berbagai metode dan subjek lain, seperti manusia, sel *in vitro*, dan hewan marmut. Selain itu, penelitian ini menggunakan krim Astaxanthin dengan dosis 0,05% dan 0,1%, sedangkan penelitian lain memakai konsentrasi dan bentuk sediaan berbeda, seperti serum, gel, lotion, atau krim dengan dosis lebih tinggi atau kombinasi dengan bahan aktif lain. Penelitian ini juga lebih mendalami mekanisme molekuler melalui ekspresi *TGF-β* dan *TNF-α*, yang belum banyak dieksplorasi dalam penelitian sebelumnya. Banyak penelitian sebelumnya hanya menilai efek klinis atau makroskopis, seperti perubahan elastisitas kulit, tingkat melanin, atau tampilan kulit yang lebih muda. Dengan demikian, penelitian ini menawarkan perspektif baru mengenai peran Astaxanthin dalam melindungi kulit dari kerusakan akibat radiasi UV-B melalui jalur molekuler yang spesifik.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

- a) Membuktikan efek perlindungan krim Astaxanthin terhadap penuaan kulit akibat paparan radiasi UV-B akut.
- b) Memberikan dasar teori lebih lanjut untuk pengembangan penelitian menggunakan krim *Astaxanthin* terhadap proteksi penuaan kulit akibat paparan UVB akut.

1.5.2 Manfaat Praktis

- a) Dapat memberi alternatif dan informasi bahwa krim *Astaxanthin* dapat mencegah penuaan dini dan melindungi kulit dari efek radiasi UV-B akut.
- b) Dapat memberikan acuan atau dasar teori untuk pengembangan produk menggunakan krim *Astaxanthin* mencegah penuaan kulit akibat paparan UV-B akut.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

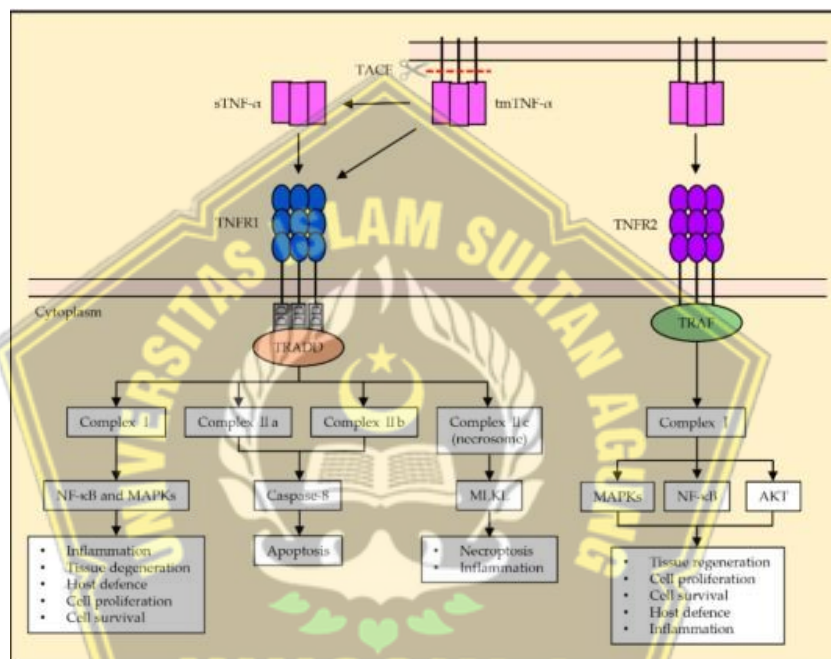
2.1 TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*)

2.1.1 Pengertian TNF- α

TNF- α adalah sitokin dengan efek pleiotropik pada berbagai jenis sel, telah diidentifikasi sebagai pengatur utama respons inflamasi, dan diketahui berperan dalam pembentukan sejumlah penyakit inflamasi dan autoimun. TNF- α adalah protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino secara struktural dan terutama dibuat oleh sel NK, limfosit T, dan makrofag aktif. TNF- α memicu berbagai molekul inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin lainnya. TNF- α memiliki kemampuan untuk mengaktifkan dan meregulasi sistem kekebalan dan merupakan bagian penting dari respons kekebalan normal secara fisiologis. Upregulasi TNF- α adalah respons awal utama sel keratinosit terhadap radiasi ultraviolet B (UVB) dan merupakan bagian penting dari kaskade inflamasi pada kulit. Ekspresi TNF- α diinduksi pada sel keratinosit dan fibroblas dermal oleh radiasi UVB, yang terjadi sedini 1,5 jam setelah UVB.^{30,31}

TNF- α adalah sitokin proinflamasi dan pleiotropik yang terutama dihasilkan oleh sel NK, makrofag, monosit, dan sel T. Namun, banyak sel lain, seperti fibroblas, keratinosit, sel otot polos, dan sel tumor, juga menghasilkan TNF- α . pengatur utama respon inflamasi dan diketahui bertanggung jawab atas beberapa penyakit inflamasi dan autoimun.³² Dua jenis TNF- α adalah bentuk terlarut (sTNF- α) dan bentuk transmembran (tmTNF- α). Salah satu cara utama TNF- α mempengaruhi sel adalah dengan mengikat reseptor TNFR1 (p55) dan

TNFR2 (p75). Kemudian, TNF- α mengirimkan sinyal molekuler untuk berbagai fungsi biologis, seperti mengontrol respons imun dan memiliki kemampuan untuk melakukan banyak hal pada sel, seperti nekroptosis, apoptosis, peradangan, proliferasi atau merangsang pertumbuhan, dan efek hematopoietik.^{32,33}



Gambar 2.1 Jalur pensinyalan TNF- α .³³

TNFR1 memicu jalur pensinyalan aktivasi NF κ B dan *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), yang dikenal persinyalan kompleks 1 atau 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

Jalur pensinyalan TNFR1 diaktifkan oleh ligasi sTNF- α dan tmTNF- α , dan *death domain* dari TNFR1 merekrut TRADD. Kompleks I mengaktifkan NF- κ B

dan MAPKs, menyebabkan peradangan dan degenerasi jaringan, pertahanan inang, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel. Kompleks IIa dan IIb memicu aktivasi caspase-8 dan menginduksi apoptosis. Sedangkan kompleks IIc menginduksi nekroptosis dan peradangan. Jalur pensinyalan TNFR2 terutama diaktifkan oleh tmTNF- α . TNFR2 tidak memiliki *death domain* dan merekrut TRAF melalui domain TRAF-nya, mengaktifkan formasi kompleks I, menghasilkan aktivasi NF- κ B dan MAPKs dan AKT. Aktivasi TNFR2 dikaitkan dengan bioaktivitas homeostatik seperti regenerasi jaringan, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel, juga sebagai pertahanan host dan peradangan.³²

2.1.2 Pensinyalan TNF- α

TNF- α merupakan protein fisiologis yang bersifat pro-inflamasi, dapat menyebabkan apoptosis sel. TNF- α pada konsentrasi rendah (0,1–10 g/ml) dapat mencegah kematian sel dengan meminimalkan fragmentasi DNA. Sementara itu, jalur NF- κ B dapat menyebabkan kematian sel akibat konsentrasi TNF- α yang tinggi (100 g/ml).³⁴ Ketidak seimbangan sitokin TNF- α , memainkan peran penting dalam penuaan, dipengaruhi oleh perubahan genetik di daerah promotor gen sitokin proinflamasi, dan teregulasi. Ini berdampak pada peradangan dan kerentanan terhadap penyakit yang terkait dengan usia.³⁵

UVB diserap oleh sel epidermis menyebabkan kerusakan DNA, meningkatkan stres oksidatif, reaktif oksigen spesies (ROS), dan menyebabkan penuaan dini.³⁶ Stres oksidatif ini memiliki potensi untuk meningkatkan produksi ROS dan memulai aktivasi sitokin pro-inflamasi, termasuk tumor necrosis factor- α (TNF- α). Melalui berbagai jalur, seperti aktivasi NF- κ B, HIF-

1a, maupun Nrf-2.³⁷ Pengikatan TNF- α ke reseptor mengaktifkan NF- κ B, memulai efek sitokin, mengaktifkan gen yang terkait dengan respon inflamasi. TNF- α juga dapat menyebabkan kematian melalui interaksi dengan *death receptor*.³⁸ Jalur apoptosis melalui TNF- α mengaktifasi caspase yang di mediasi oleh *Caspase-8* sampai mengaktifasi *Caspase-3* (*Caspase* efektor yang meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasiprotein dan menginisiasi jalur *Caspase* menjadi program kematian sel).³⁹

UVB adalah sumber utama sengatan matahari setiap hari dan ketidaknyamanan lainnya, seperti eritema. Efeknya pada tingkat ekspresi mRNA sitokin di jalur MAPK/AP-1, radiasi UVB meningkatkan regulasi tingkat ekspresi sitokin utama pada jalur MAPK/AP-1, sehingga meningkatkan transmisi jalur MAPK/AP-1, dan transkripsi hilir faktor inflamasi dan gen MMP. Keratinosit yang diradiasi mengeluarkan sitokin inflamasi IL-1 β , IL-6, IL-8, dan TNF- α secara berlebihan, dengan mengaktifkan jalur NF- κ B.⁴⁰

Radiasi adalah salah satu pemicu stres yang dapat mengaktifkan p53. Stres meningkatkan pembentukan ROS, yang mengaktifkan jalur respons stres MAPK p38 dan mendorong apoptosis. Smac menghambat fungsi inhibitor protein apoptosis (IAP), yang menginduksi apoptosis ketika dilepaskan dari celah antar membran mitokondria ke dalam sitoplasma. Bagian penting lainnya oleh protein penekan tumor p53, mengatur siklus sel yang penting.³⁹

2.1.3 Faktor yang mempengaruhi ekspresi TNF- α dan TGF- β

Stres oksidatif dianggap sebagai faktor utama yang menyebabkan penuaan kulit. Genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal adalah faktor intrinsik

yang berperan dalam proses penuaan kulit yang kompleks. Selain itu, faktor ekstrinsik seperti radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan dapat memengaruhi bagaimana kulit menjadi lebih tua.^{41,42} Penuaan kulit secara instrinsik menyebabkan lapisan epidermis menipis, daerah kontak permukaan dermis dan epidermis menipis, yang mengakibatkan penurunan jumlah nutrisi yang dikirim ke epidermis. Kulit mudah robek dan lecet akibat trauma ringan. Kemampuan untuk proliferasi sel basal menurun. Jika dibandingkan dengan kulit muda, lapisan dermis mengandung lebih sedikit sel mast dan fibroblas. Ini juga terjadi pada serat kolagen dan elastin.⁴²

Sinyal TGF- β /Smad yang menurun dan faktor pertumbuhan jaringan ikat yang berkurang, produksi prokolagen tipe 1 di kulit yang menua berkurang. Komponen matriks ekstraseluler (fibrilin, kolagen, dan elastin) dan oligosakarida mengalami degenerasi, yang berdampak pada kemampuan kulit untuk menahan air. Mengetahui mekanisme molekular yang paling baru serta perubahan yang disebabkan oleh penuaan adalah penting untuk menentukan strategi terbaik untuk mencegah dan mengobati penuaan kulit karena mekanisme yang mendasari penuaan kulit terus berubah. Faktor intrinsik terdiri dari genetik, metabolisme sel, dan perubahan hormonal. Faktor ekstrinsik bertanggung jawab atas penuaan kulit. Selain itu, faktor ekstrinsik seperti radiasi ultraviolet, inframerah, dan karsinogen lingkungan berkontribusi pada penuaan kulit.⁴¹

2.1.4 Pengukuran dengan metode IHC

Pemeriksaan imunohistokimia adalah pemeriksaan imunopatologik yang sangat potensial untuk memeriksa antigen secara lokal di jaringan yang

menggunakan antibodi spesifik. Ini sangat mampu memisahkan, menseleksi, dan bersifat spesifik, dan mendeteksi antigen karena ikatan khusus antara antigen dan antibodi. Imunohistokimia sering digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Proses ini juga sering digunakan untuk penelitian dasar untuk mengetahui distribusi dan lokasi biomarker dan protein yang terekspresi pada berbagai jenis jaringan tubuh. Imunohistokimia menggabungkan imunologi dan histologi. Prinsip-prinsip dasar imunologi digunakan dalam imunohistokimia untuk mewarnai bahan aktif atau antigen di dalam jaringan. Antibodi (antibodi) mengikat bahan aktif (antigen) pada sisi aktif tertentu. Jika antibodi diikat oleh penanda (marker) seperti fluoresin, enzim, bahan partikel, atau isotop yang dapat divisualisasikan, hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen. Ini dapat menunjukkan keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa asam nukleat, lemak, protein, karbohidrat, atau jenis bahan alami lainnya selain bahan sintetik.⁴³

Prosedur pemeriksaan dengan IHC dimulai dengan membuat preparat histologi dengan insisi jaringan kulit. Ini dilakukan melalui proses dehidrasi, pembersihan (clearing), pembedahan (impregnasi/embedding), pengecoran (blocking), dan pemotongan (sectioning). Pita tipis yang terbentuk dari pemotongan ini dimasukkan ke dalam bak air hangat dan diambil dengan kaca objek yang diolesi albumin gliserin. Setelah itu, dilakukan inkubasi semalam di inkubator dan kemudian dilakukan pewarnaan.⁴⁴

2.2. TGF- β (*Transforming growth factor beta*)

2.2.1. Pengertian TGF- β

Ligan TGF- β terdiri dari tiga isoform, TGF- β 1, 2, dan 3. TGF- β 1 dominan dalam ekspresi dalam berbagai jenis sel dan jaringan.⁴⁵ Superfamili TGF- β yang mencakup *bone morfogenik protein* (BMP), *Growth differentiation factor* (GDF), dan aktivin. Ligan TGF- β disintesis sebagai protein prekursor yang lebih besar. Bagian N-terminalnya dibelah untuk melepaskan ligand yang matang di C-terminal dalam bentuk homodimer. Peptida N-terminal yang dibelah, juga dikenal sebagai *Inhibitor protein apoptosis* (IAP), secara fisik terikat dengan ligand C-terminal. TGF- β s laten, atau protein pengikat TGF- β laten (LTBPs), memungkinkan homodimer TGF- β dewasa untuk menghentikan aktivitasnya. Lingkungan mikro asam atau pencernaan enzimatik dapat melepaskan TGF- β aktif.⁴⁶

Pelepasan TGF- β dari LAP, TGF- β aktif akan berikatan dengan reseptor transmembran tipe 2 TGFBR2 yang merupakan serin/treonin kinase untuk merekrut dan mengaktifkan TGFBR1 melalui fosforilasi, kemudian memfosforilasi Smads yang diatur reseptor (R-Smad), R-Smads yang diaktifkan membentuk kompleks dengan Smad4 (common Smad atau Co-Smad) dan mentranslokasi ke dalam nukleus untuk mengatur transkripsi gen target. Sedangkan Smad7 penghambat yang diinduksi oleh Smad3 dan berikatan dengan TGFBR1 untuk menghambat fosforilasi Smad2 dan Smad3. Selain itu, Smad7 juga dapat berfungsi untuk mendegradasi TGFBR1 dengan merekrut E3 ubiquitin ligase Smurf2. Dengan demikian, Smad7 secara negatif memodulasi

pensinyalan TGF- β melalui mekanisme umpan balik negatifnya.⁴⁷

Pengikatan ligan TGF- β aktif ke reseptor juga difasilitasi oleh betaglikan koreseptor tambahan yang terikat membran (TGFBR3) dan endoglin. Betaglikan meningkatkan daya tanggap pensinyalan TGF- β dengan mengirimkan ligan TGF- β ke TGFBR2 untuk membentuk kompleks terner. Berbeda dengan betaglikan yang terikat membran, betaglikan yang larut mencari aktivitas sinyal TGF- β dan transduksi sinyal dari ligan TGF- β ke reseptor yang terikat membran. Selain itu, betaglikan yang larut juga dapat terlepas dari membran untuk membentuk betaglikan yang larut. transduksi sinyal TGF- β ke reseptor yang terikat membran, Smad2/3 juga dapat diaktifkan oleh crosstalk dengan jalur MAPK ERK/p38.⁴⁷

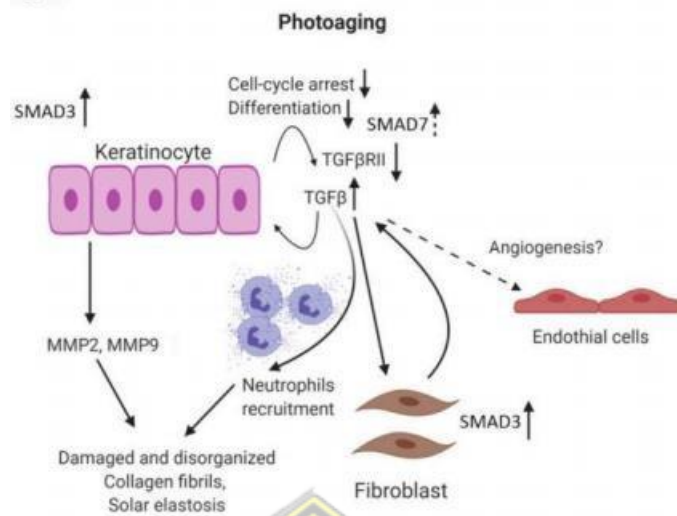
TGF- β 1 juga dapat mengaktifkan berbagai jalur Smad-independen (dikenal sebagai pensinyalan non-Smad) untuk menunjukkan bioaktivitasnya. Jalur non-Smad ini termasuk *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1), *phosphatidylinositol 3-kinase/AKT*, dan jalur pensinyalan *Rho like GTPase*.⁴⁶ Aktivasi jalur independen Smad ini dapat berfungsi sendiri atau secara sinergis dengan pensinyalan Smad untuk mengatur respons seluler.⁴⁷

2.2.2. Pensinyalan TGF β

Pensinyalan TGF β memiliki fungsi dalam mengatur pertumbuhan sel, diferensiasi, migrasi, respons imun/inflamasi, dan angiogenesis. TGF β 1 disekresikan dalam bentuk laten. TGF β 1 aktif dilepaskan ketika N-terminal laten peptida terkait (LAP) dibelah dari TGF β 1 matang oleh sejumlah mediator

termasuk MMP2/MMP9, ROS dan integrin. Dalam TGF β kanonik pensinyalan, TGF β berikatan dengan dua jenis reseptor serin/treonin kinase, TGF β RI dan TGF β RII, memicu kaskade sinyal intraseluler. Ketika TGF β berikatan menjadi kompleks TGF β RII/TGF β RI, Smad2 dan Smad3 terfosforilasi oleh TGF β RI, diikuti oleh mengikat dengan Smad4 membentuk kompleks heteromerik dan mentranslokasi ke nukleus, tempat mereka menerapkan regulasi transkripsi melalui elemen pengikat Smad (SBE). Selain itu, pensinyalan TGF β melalui jalur non-kanonik termasuk ERK, p38/JNK, Rho/Rac, dan PI3K/AKT (Zhang, 2017). Smad7 diinduksi oleh pensinyalan TGF β dan berfungsi sebagai penghambat TGF β melalui larangan fosforilasi Smad2/3 dan pencegahan pembentukan kompleks Smad2/3/4.⁴⁸

Pensinyalan TGF β memainkan peran spesifik yang penting dalam berbagai fungsi fisiologis dan peristiwa patologis. TGF β adalah penghambat pertumbuhan untuk keratinosit dan stimulator pertumbuhan fibroblas dermal, efek penghambatan pertumbuhan sinyal TGF β menjadikannya faktor penekan tumor yang kuat pada tahap awal kanker. TGF β juga mengatur deposisi matriks ekstraseluler (ECM). Selama photoaging di kulit, TGF β diregulasi dan diaktifkan, menginduksi MMP berlebihan dan sitokin pro-inflamasi dan infiltrasi neutrofil yang berkepanjangan, menyebabkan degradasi kolagen progresif dan serat elastis menyimpang yang berkontribusi terhadap penghancuran ECM.⁴⁸



Selama photoaging, produksi TGF- β yang diturunkan dari keratinosit menginduksi fotoinflamasi oleh MMP2, MMP9, dan perekrutan neutrofil. Sementara itu, fibroblas di dermis mengaktifkan sinyal TGF β /Smad3 untuk menginduksi respons fibrotik. Efek ini menyebabkan kerusakan pada fibril kolagen dan pembentukan elastosis surya.⁴⁸

Paparan sinar UVB menginduksi aktivasi faktor nuklir kappa B (NF- κ B). Memicu mediator inflamasi termasuk IL-1, IL-6, dan TNF α . Kerusakan DNA akibat UV bertanggung jawab atas aktivasi NF- κ B telah diuji secara langsung. Sel yang dienukleasi sepenuhnya responsif terhadap aktivasi NF- κ B yang dipapar oleh UV. Ketergantungan panjang gelombang (spektrum aksi) untuk produksi TGF- β yang dipapar UV berkorelasi dengan spektrum aksi in vivo untuk pembentukan CPD yang dipapar UV. Produksi TGF- β berkorelasi dengan jumlah kerusakan DNA, membuat adanya hubungan antara keduanya.⁴⁹

Bersama dengan IL-1, TNF α , IL-6 adalah sitokin pertama yang ditemukan diregulasi di kulit setelah radiasi sinar UV. Kemudian ditemukan bahwa

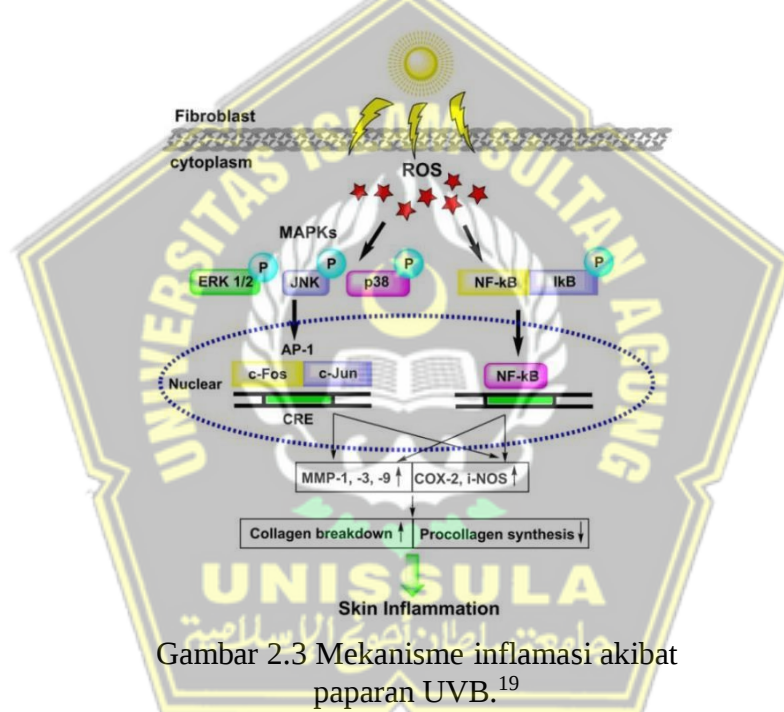
keratinosit dan sel mast merupakan sumber TGF- β . Setelah diekspersikan, TNF- β memiliki efek pada berbagai tipe sel. Ini juga dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas I pada sel endotel dan fibroblas dermal yang dapat menginduksi produksi IL-1, meningkatkan ekspresi molekul adhesi, termasuk ICAM-1, VCAM-1 dan E-selectin dan menjadi pembentukan sel kulit terbakar. Meningkatkan regulasi molekul adhesi pada sel endotel, TGF- β membantu mendukung migrasi neutrofil dan makrofag ke kulit yang terpapar sinar UV.⁴⁹

2.3 Sinar Ultraviolet B (UV-B)

Paparan radiasi UV yang berlebihan pada kulit memicu remodeling sistem kekebalan tubuh dan menyebabkan kondisi photoaging yang mengingatkan kita pada penuaan kronologis. UVB dapat merusak struktur DNA dan protein pada sel-sel kulit, khususnya pada epidermis. Penghambatan hipersensitivitas kontak oleh paparan UVB merupakan pengamatan penting yang menunjukkan bahwa UVB menstimulasi imunosupresi pada kulit, stres yang disebabkan oleh UVB memicu kondisi peradangan lokal pada kulit.⁵⁰

Penuaan kulit dibagi menjadi penuaan intrinsik dan penuaan ekstrinsik. Penuaan intrinsik sangat berkorelasi dengan faktor genetik. Sebaliknya, penuaan ekstrinsik disebabkan oleh beberapa faktor lingkungan, seperti sinar ultraviolet (UV), polusi udara, bahan kimia, dan racun lingkungan. Diantaranya, faktor penyebab penuaan kulit terbesar adalah paparan sinar UV. Ultraviolet terdiri dari panjang gelombang 200 hingga 400 nm dan dibagi menjadi tiga bagian: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), dan UVC (200–280 nm). UVA dan UVB memiliki efek biologis pada kulit, dan meskipun UVA menempati sebagian besar sinar UV,

namun bersifat karsinogenik lemah. UVB menembus jauh ke dalam epidermis dan dermis dan lebih berbahaya secara biologis. Paparan berulang terhadap UVB mempengaruhi fibroblas yang ada di dermis. Fibroblas terlibat dalam sintesis kolagen dan menempati sebagian besar jaringan ikat. Oleh karena itu, kulit yang terkena sinar matahari ditandai dengan kerutan yang tebal dan dalam, kulit kering, dan hilangnya elastisitas. Percepatan penuaan kulit akibat akumulasi paparan sinar UV secara terus menerus disebut skin photoaging.^{19 51 52}



Gambar 2.3 Mekanisme inflamasi akibat paparan UVB.¹⁹

Radiasi UVB meningkatkan penguraian matriks metaloproteinase (MMPs) kulit protein ECM. MMP1 secara khusus mendegradasi kolagen tipe 1. Hal ini diatur oleh MAPK, sebuah sinyal hulu kaskade yang terdiri dari kinase teregulasi sinyal ekstraseluler (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK). MAPK yang diaktifkan oleh iradiasi UV meningkatkan ekspresi AP-1, suatu trans-faktor transkripsi MMP yang terdiri dari heterodimer Jun dan Fos. MMP penting lainnya NF-κB, dilokalisasi ke sitoplasma oleh IκBα, tetapi rusak akibat radiasi UVB,

mengakibatkan disosiasi I κ B α dan translokasi NF- κ B ke nukleus. NF- κ B yang ditranslokasi meningkatkan sitokin proinflamasi TNF- α , interleukin-6 (IL-6), dan interleukin-1 β (IL-1 β) berkontribusi kerusakan kulit.¹⁹

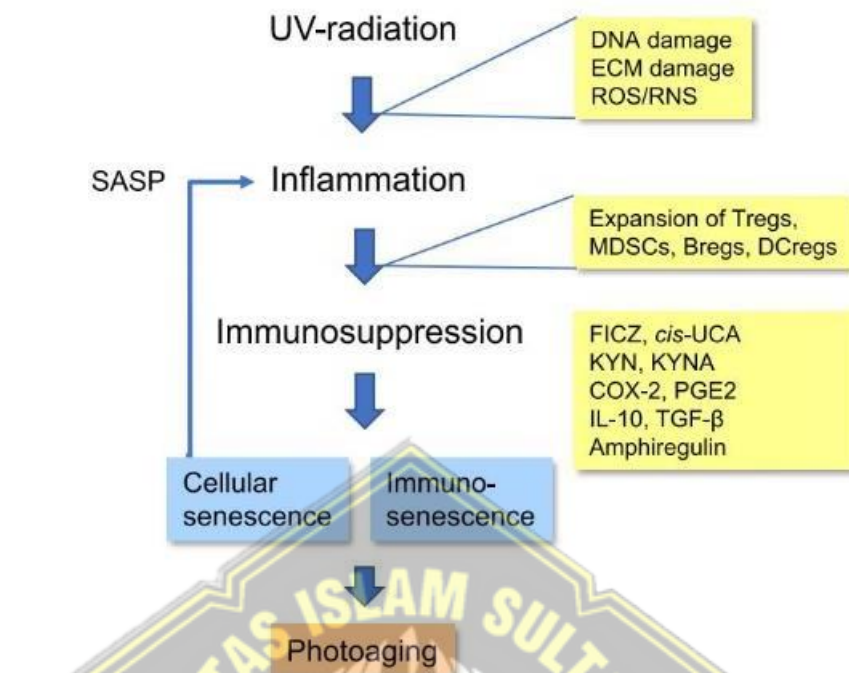
UVB juga mempengaruhi jalur TGF- β /Smad, yang merupakan perwakilan kolagen jalur sintesis. Transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF- β) merangsang biosintesis kolagen tipe 1 dan mengatur homeostasis kolagen melalui molekul pemberi sinyal Smad. Reaktif oksigen Spesies (ROS) yang dihasilkan oleh radiasi UV merusak sinyal TGF- β jalur dengan mengurangi transformasi ekspresi faktor pertumbuhan- β reseptor II (TGF- β RII), dan menurunkan regulasi fosforilasi Smad3. Jalur TGF- β /Smad yang diinduksi UVB merupakan salah satu mekanisme penyebab hilangnya kolagen. Peningkatan ROS disebabkan oleh iradiasi UV terus menerus disertai dengan stres oksidatif. Nrf-2 dapat mengais ROS dan merupakan sistem perlindungan antioksidan terhadap stres oksidatif. Dalam keadaan normal, Nrf-2 membentuk kompleks dengan Keap1 di sitoplasma. Nrf-2 dipisahkan dari kompleks Nrf-2/Keap1 dan ditranslokasi ke nukleus oleh rangsangan seperti penyinaran UVB. Hasilnya adalah heme oksigenase-1 (HO-1) dan antioksidan enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPx), dan katalase (CAT) diregulasi. Jadi, ketika jalur pensinyalan Nrf-2/HO-1 distimulasi, ekspresi faktor terkait antioksidan diaktifkan untuk mempertahankan reduksi oksidasi homeostasis sel. Oleh karena itu, memulihkan berbagai jalur sinyal terkait UV iradiasi bisa menjadi strategi yang efektif dalam mencegah photoaging.¹⁹

Berbagai faktor termasuk intensitas dan durasi paparan sinar ultraviolet, jenis kulit, dan tingkat perlindungan yang digunakan, menentukan intensitas sengatan

matahari.⁵³ Paparan sinar matahari pada lapisan terluar kulit dapat menyebabkan peradangan atau iritasi. UV menyebabkan masalah kesehatan yang signifikan, baik langsung maupun jangka panjang, seperti eritema, kerusakan kolagen dan elastin, photoaging, dan kerusakan jaringan kulit langsung karena stres oksidatif yang merusak lipid, protein, dan DNA.⁵⁴

Peradangan kronis tingkat rendah dikaitkan dengan proses photoaging pada kulit, kehadiran lingkungan mikro inflamasi dalam jangka panjang meningkatkan risiko karsinogenesis dan metastasis. Kerusakan DNA yang diinduksi UV dan perubahan ECM mengganggu homeostasis dan memicu tekanan seluler yang mengaktifkan respons inflamasi pada kulit. Jalur NF- κ B dan p38 MAPK merupakan penginduksi utama respon inflamasi, baik pada sel non-imun maupun sel imun pada kulit. Terdapat bukti yang meyakinkan bahwa radiasi UVB juga menimbulkan peradangan dengan mengaktifkan inflamasiom.⁵⁵

Paparan UV menyebabkan kerusakan pada DNA dan ECM kulit. UV juga meningkatkan pembentukan senyawa ROS/RNS dan karenanya meningkatkan stres oksidatif. Perubahan yang diinduksi UV menimbulkan peradangan keadaan mati di kulit. Selanjutnya, peradangan merangsang perluasan sel imunosupresif di kulit, sehingga melawan dalam keadaan inflamasi. Perluasan Treg, MDSC, Breg, dan DCregs meningkatkan aktivitas imunosupresif di kulit.⁵⁵



Gambar 2.4 Mekanisme photoaging akibat paparan UV.⁵⁵

Ada beberapa mekanisme yang dapat membangkitkan imunosupresif keadaan di kulit: (i) UVR merangsang pembentukan FICZ dan senyawa cis-UCA, (ii) peradangan merangsang sintesis KYN dan KYNA, (iii) peradangan mengaktifkan COX-2 dan meningkat generasi PGE2, (iv) sel imunosupresif mengeluarkan anti-sitokin inflamasi, seperti IL-10 dan TGF- β , dan (v) imun sel mengeluarkan amphiregulin yang memberikan aktivitas supresif Treg. Aktivasi imunosupresi peradangan UVR jalur mempromosikan penuaan sel imun dan non-imun di kulit. Sel-sel tua mengekspresikan sekretori pro-inflamasi fenotipe (SASP) yang mendorong bukti perubahan patologis di kulit. Peradangan kronis dan sistem imun yang melawannya imunosupresi menyebabkan perubahan degeneratif pada kulit yang menyebabkan keadaan *photoaging*.⁵⁵

Pada fase inflamasi berikutnya kulit diinfiltrasi oleh neutrofil, monosit, dan

sel T, fase ini juga melibatkan peningkatan ekspresi dan sekresi sitokin proinflamasi dan inflamasi lainnya mediator. Fase ketiga, disebut regresif atau resosibel, fase lusi, mengandung banyak tanggapan penangkal peradangan akut. Fase resolusi terdiri dari banyak peristiwa anti-inflamasi, seperti rekrutmenment dan perluasan sel immunosupresif di kulit yang terkena, serta sekresi anti-inflamasi sitokin, seperti IL-4, IL-10, TGF- β . Ada penelitian menunjukkan bahwa resolusi peradangan akut memicu menyebabkan resolusi pasca immunosupresif yang berkepanjangan fase ini bersamaan dengan proses perbaikan pada bagian yang meradang jaringan. pengobatan UV menginduksi peningkatan yang jelas dalam ekspresi dan sekresi IL-10 dan Sitokin TGF- β pada keratinosit manusia, paparan berulang terhadap UVB menyebabkan penuaan dini yang dipicu oleh TGF- β fibroblas kulit manusia. Saat ini diketahui bahwa UVR menginduksi remodeling mendalam pada sistem kekebalan tubuh kulit dan inflamasi berkepanjangan dan immunosupresif keadaan sive mungkin menyebabkan photoaging pada kulit.⁵⁵

2.4 *Astaxanthin*

Astaxanthin merupakan antioksidan kuat yang berasal dari karotenoid yang merupakan kelompok *xanthophyll* tetapi tidak memiliki aktivitas seperti vitamin A. *Astaxanthin* disintesis oleh tumbuhan, bentuk pigmen bewarna orange-merah yang larut dalam lemak. *Astaxanthin* sebagai sumber antioksidan terbaik karena mempunyai kekuatan 50-100 kali lebih kuat dari vitamin E dan membantu vitamin C dalam aktivitasnya sebagai antioksidan. Rancangan formulasi sediaan kosmetik yang mengandung *astaxanthin* mempunyai aktivitas antioksidan sangat baik dapat diformulasikan dalam sediaan kosmetik dalam

bentuk krim, gel dan lotion.⁵⁶ *Astaxanthin* adalah salah satu contoh oksidan alam yang berfungsi untuk menghentikan aktivitas radikal bebas. Antioksidan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif dengan menghentikan kerusakan sel.⁵⁶

Astaxanthin berfungsi melindungi terhadap sinar ultraviolet, pigmentasi, mengontrol imunitas, perlindungan antioksidan, dan menahan stres oksidatif. Menurut penelitian *ataxanthin* meningkatkan kesehatan kulit dengan mempengaruhi berbagai fase kerusakan oksidatif, pigmentasi dan menekan beberapa mediator inflamasi. Berkontribusi pada pengurangan kerutan dan penghambatan penuaan akibat sinar matahari, menurut beberapa studi klinis.⁵⁷ Efek pemulungan *astaxanthin* untuk oksigen singlet kira-kira 1000 kali lebih tinggi dibandingkan koenzim Q10. *Astaxanthin* diserap dari usus kecil, diangkut ke plasma dan eritrosit, pada otak dengan melewati sawar darah-otak,⁵⁸ dan ke kulit termasuk epidermis dan dermis. Berdasarkan aktivitas anti-oksidasinya yang kuat, efek menguntungkan dari *astaxanthin* sebagai suplemen telah dievaluasi untuk berbagai masalah kesehatan manusia termasuk metabolisme, kinerja olahraga, fungsi kognitif dan kelelahan mental (dikombinasikan dengan atau tanpa sesamin),^{58,59} efisiensi tidur (dikombinasikan dengan zinc) dan kondisi kulit, efek pemulungan oksigen tunggal yang kuat, peran perlindungan *astaxanthin* untuk kondisi kulit atau kerusakan kulit akibat sinar UV telah dievaluasi pada sel, hewan pengerat, dan manusia.⁶⁰

Oksigen singlet merupakan oksidan utama yang dihasilkan oleh sinar UV. Karena *astaxanthin* yang diserap mencapai epidermis dan dermis dan memiliki

aktivitas pemulungan oksigen singlet yang kuat, *astaxanthin* secara langsung memberikan aktivitas anti-oksidatif pada epidermis dan dermis untuk melindungi kulit dari kerusakan kulit akibat sinar UV. *Astaxanthin* juga mencegah produksi lipid peroksida yang diinduksi UV secara *in vivo* dan peningkatan regulasi enzim penghasil ROS, xanthine oksidase dan NADPH oksidase. Selain itu, pemberian *astaxanthin* mencegah penurunan ekspresi enzim antioksidan endogen yang diinduksi UV seperti superoksida dismutase dan glutathione peroksidase.⁵⁹

Astaxanthin meningkatkan efek anti-oksidatif endogen untuk mengurangi aktivasi enzim penghasil ROS yang diinduksi UV. Mencegah peningkatan interleukin (IL)-1 α , IL-6, IL-8 dan *tumor necrosis factor* (TNF)- α yang diinduksi UV secara *in vitro* dan *myeloperoxidase*, TNF- α , IL-1 β dan IL-6 *in vivo*. penelitian sebelumnya menunjukkan efek menguntungkan *astaxanthin* untuk pengobatan dermatitis atopik.⁵⁹

Antioksidan yang kuat pada *astaxanthin* memiliki kemampuan menangkal radikal bebas hingga 6000 kali lebih kuat daripada vitamin C dan 100 kali lebih kuat daripada vitamin E. Melindungi kulit dari kerusakan akibat sinar UV dan stres oksidatif, sehingga mencegah penuaan dini, mengurangi peradangan kulit, seperti kemerahan, iritasi, atau gejala inflamasi lainnya, menjadikannya bermanfaat untuk kulit sensitif atau bermasalah. *Astaxanthin* mendukung sintesis kolagen dan mencegah degradasi kolagen yang dipicu oleh UV, yang penting untuk menjaga kekencangan dan elastisitas. *Astaxanthin* menjaga kelembapan kulit dengan mengurangi *transepidermal water loss* (TEWL),

sehingga kulit tetap terhidrasi dan lembap, membantu mengurangi hiperpigmentasi dan memperbaiki warna kulit yang tidak merata, menjadikannya bermanfaat dalam produk pencerah kulit.⁶¹

Astaxanthin dapat digunakan dalam berbagai jenis produk kosmetik seperti:

- Krim wajah dan serum anti-penuaan untuk membantu mengurangi kerutan, garis halus, dan meningkatkan elastisitas kulit.
- Tabir Surya untuk perlindungan tambahan terhadap kerusakan UV dan memperkuat efektivitas filter UV.
- Produk pencerah kulit untuk meningkatkan warna kulit yang merata dan mengurangi noda gelap.
- Pelembap harian untuk menjaga hidrasi kulit sepanjang hari sambil memberikan perlindungan antioksidan.
- Masker wajah untuk memberikan perawatan intensif dengan meningkatkan hidrasi dan mengurangi stres oksidatif.
- Produk perawatan rambut untuk melindungi rambut dari kerusakan oksidatif dan menjaga kulit kepala tetap sehat.

Keunggulan Astaxanthin bersifat Lipofilik dan Hidrofilik, Astaxanthin dapat larut dalam lipid, sehingga mudah diserap oleh lapisan kulit, Telah terbukti aman untuk penggunaan topikal dengan risiko iritasi kulit yang minimal. Astaxanthin sensitif terhadap cahaya, panas, dan oksigen, sehingga memerlukan teknik stabilisasi seperti mikroenkapsulasi, nanoemulsi, atau liposom, astaxanthin berwarna merah-oranye kuat, sehingga dapat memengaruhi warna akhir produk kosmetik.⁶¹

2.5 Mekanisme penetrasi krim pada kulit

Paparan eksogen yang berulang-ulang dapat mengganggu pertahanan kulit sehingga mempengaruhi kemampuannya untuk mempertahankannya kadar air dan mengganggu lipid pada stratum korneum sehingga memicu transepidermal water loss (TEWL) sehingga menyebabkan kulit menjadi bersisik, kusam, gatal, dan lebih sensitif. Kulit juga mengandung pelembab alami yang disebut natural pelembab faktor (NMF). Namun jika NMF tidak cukup untuk menjaga kelembapan kulit, diperlukan perlindungan tambahan dengan menggunakan pelembab kosmetik. Pelembab adalah produk yang bertujuan untuk meningkatkan hidrasi kulit dan menjaga pH kulit normal.²³

Pelembab yang benar adalah dengan mengoleskannya pada telapak tangan lalu mengoleskannya pada kulit wajah searah dengan folikel rambut. Hal ini dilakukan untuk mencegah folikulitis minyak pada lapisan kulit. Sedangkan pengaplikasian salep lebih merata dibandingkan formulasi produk dengan viskositas rendah dan bahan mudah menguap. Penetrasi bahan ke permukaan kulit lebih mudah dilakukan krim dan salep dibandingkan dengan lotion dan tingtur. Setelah dioleskan pada kulit, bahan akan perlahan meresap ke dalam kulit, kemudian akan mengalami metabolisme atau hilang dari kulit karena penguapan, pengelupasan atau karena kontak dengan bahan lain. Pelembab dapat menghidrasi kulit dan mencegah hilangnya air berlebih dari kulit melalui mekanisme oklusif. Dalam hal ini, bertindak mengembalikan kadar air pada kulit menggunakan humektan dengan cara menarik air dari lapisan epidermis ke SC. Penggunaan pelembab humektan cocok untuk aktivitas luar ruangan.²³

Pelembab idealnya mempunyai sifat yang dapat memenuhi kebutuhan dasar konsumen, seperti meningkatkan kehalusan dan kelembutan kulit, memperbaiki penampilan kulit. Hasil akhir yang dibutuhkan konsumen dari penggunaan pelembab pada wajah adalah menjadikan kulit lembut dan halus. Kelembutan dan kehalusan kulit dapat diukur dari lapisan keratinosit (korneosit) yang mati pada permukaan kulit wajah. Ketika lapisan lipid hilang karena penggunaan pelembab, sisi korneosit yang terlipat menimbulkan gesekan saat tangan digosok permukaan kulit, sehingga dapat membuat kulit terasa lebih halus dan lembut bila menggunakan emolien dari pelembab. Meningkatkan hidrasi kulit Pelembab yang relevan secara ilmiah harus menjaga kulit tetap terhidrasi melalui hilangnya air transepidermal (TEWL) mekanisme. Pelembab ini akan memperlambat dan menghambat penguapan air dari permukaan kulit.⁶²

Mekanisme TEWL diperoleh dengan memberikan bahan lapisan kedap air dan mengaplikasikannya pada permukaan kulit untuk menarik air dan mencegah penguapan yang cepat. Peningkatan hidrasi kulit dapat mengurangi kerutan akibat dehidrasi, terutama di sekitar mata yang memiliki lapisan kulit paling tipis. Mekanisme TEWL dapat menghidrasi kulit untuk sementara hingga pelembab wajah hilang pembersihan. Beberapa bahan yang dapat menurunkan TEWL bersifat oklusif antara lain minyak bumi, parafin, dimetikon, siklometikon, dan minyak mineral. Memperbaiki penampilan kulit merupakan fungsi pelembab dalam memperbaiki penampilan kulit yang disebut juga dengan luminositas. Seiring bertambahnya usia, kadar komponen kulit, seperti melanin dan hemoglobin, serta distribusi kolagen menjadi terganggu. Oleh karena itu pelembab wajah diperlukan

karena dapat memberikan lapisan pigmentasi yang tipis pada kulit atau meningkatkan pantulan dari permukaan kulit memperbaiki penampilan. Beberapa bahan yang dapat memperbaiki penampilan kulit pada pelembab adalah pigmen dan bahan reflektif optik seperti sisik ikan atau mika, oksida besi yang memiliki manfaat anti penuaan. Profil keamanan pelembab dinilai cukup tinggi dibandingkan obat tradisional, hal ini diperkuat dengan jaranganya laporan mengenai dampak buruk penggunaan pelembab.⁶³

Penghalang kulit dalam kondisi yang tepat diperlukan untuk mengatur kehilangan air secara evaporatif menjaga tingkat hidrasi penting untuk reaksi enzim yang memfasilitasi deskuamasi dan maturasi stratum korneum. Pelembab kulit penting untuk kelenturan dan aspek lain dari penampilan yang sehat. Jika kadar air dalam *stratum corneum* (SC) 10-20% menurun, lapisan pelindung kulit mulai menjadi kering. Dalam hal ini produk kosmetik biasanya digunakan untuk meningkatkan kesehatan, melembabkan kulit dan mengatasi tanda-tanda kekeringan.^{62,64}

Pelembab mencegah hilangnya air melalui evaporasi ke lingkungan dengan menempatkan zat berminyak pada permukaan kulit dimana air tidak dapat menembusnya, sehingga mengisi kembali kelembaban SC dengan air yang bergerak dari lapisan epidermis dan dermal yang lebih rendah. Vaseline, bahan yang larut dalam minyak dalam formula kosmetik, telah diusulkan sebagai pengobatan terbaik untuk kekeringan, di antara berbagai sifat oklusifnya. Namun, Vaseline merupakan bahan yang tebal dan mengandung lilin sehingga sulit ditangani dan tidak nyaman untuk penggunaan umum, terutama pada area tubuh

yang luas. Vaseline dapat menembus lebih dalam ke dalam kulit, artinya dapat digunakan sebagai substrat untuk tujuan medis atau untuk area sasaran yang lebih dalam.^{65,66}

2.6 Pengaruh Pemberian krim *Astaxanthin* terhadap kadar TGF- β dan TNF- α pada tikus yang dipapar sinar UVB

Paparan UVB berlebih pada lapisan terluar kulit dapat menyebabkan peradangan atau iritasi, menyebabkan masalah kesehatan kulit, baik langsung maupun jangka panjang, seperti eritema, kerusakan kolagen dan elastin, photoaging, dan kerusakan jaringan kulit langsung karena stres oksidatif yang merusak lipid, protein, dan DNA,⁵⁴ protein pada sel-sel kulit, khususnya pada epidermis, menstimulasi imunosupresi pada kulit, stres yang disebabkan oleh UV memicu kondisi peradangan lokal pada kulit.⁵⁰

Penyembuhan merupakan proses yang sangat kompleks yang mencakup aktivasi berbagai jenis sel, pembuatan berbagai jenis sitokin dan kemokin, dan berbagai komponen lain yang mempengaruhi respon imun, meningkatkan kemungkinan kesalahan. Jika molekul pensinyalan proinflamasi dan antiinflamasi tidak seimbang, ini dapat menyebabkan inflamasi yang terlalu kuat dan berkepanjangan yang mengakibatkan jaringan parut patologis.⁶⁷ Mekanisme pertahanan luka pertama adalah respon inflamasi yang penting untuk proses penyembuhan secara keseluruhan. Respon inflamasi mengimbangi sinyal anti-inflamasi dan pro-inflamasi, tetapi peningkatan peradangan merugikan proses penyembuhan.⁶⁸

Ekspresi TNF- α pada sel keratinosit dan fibroblas dermal diinduksi oleh radiasi UVB, yang merupakan komponen penting dari kaskade inflamasi pada kulit. Upregulasi TNF- α adalah respons awal utama sel keratinosit terhadap UVB. Ekspresi mRNA TNF- α terlihat sedini 1,5 jam setelah UVB.^{30,31} Selain itu, sitokin pro-inflamasi memainkan peran utama dalam mengatur produksi mediator inflamasi pada luka melalui mekanisme baru dengan merangsang produksi beberapa sitokin dan kemokin yang berdampak pada aspek klinis penting dari biologi luka.⁶⁹

Radiasi UV meningkatkan penguraian matriks metaloproteinase (MMPs) kulit protein ECM. NF- κ B yang ditranslokasi meningkatkan sitokin proinflamasi TNF- α , berkontribusi kerusakan kulit.¹⁹ UVB juga mempengaruhi jalur TGF- β /Smad, yang merupakan perwakilan kolagen jalur sintesis. Transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF- β) merangsang biosintesis kolagen tipe 1 dan mengatur homeostasis kolagen melalui molekul pemberi sinyal Smad. Reaktif oksigen Spesies (ROS) yang dihasilkan oleh radiasi UV merusak sinyal TGF- β jalur dengan mengurangi transformasi ekspresi faktor pertumbuhan- β reseptor II (TGF- β RII). dan menurunkan regulasi fosforilasi Smad3. Jalur TGF- β /Smad yang diinduksi UVB merupakan salah satu mekanisme penyebab hilangnya kolagen.¹⁹

Astaxanthin berfungsi untuk menghentikan aktivitas radikal bebas. Antioksidan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif dengan menghentikan kerusakan sel,⁵⁶ melindungi terhadap sinar ultraviolet, pigmentasi, mengontrol imunitas, perlindungan antioksidan, dan menahan stres oksidatif, meningkatkan kesehatan kulit dengan mempengaruhi berbagai fase kerusakan

oksidatif, pigmentasi dan menekan beberapa mediator inflamasi. *Astaxanthin* berkontribusi pada pengurangan kerutan dan penghambatan penuaan akibat sinar matahari.⁵⁷



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori

Paparan UVB pada kulit menyebabkan peningkatan NADPH oksidase yang menyebabkan peningkatan ROS, yang kemudian mengaktifkan jalur sinyal pada keratinosit di epidermis dan fibroblas di dermis, yang menyebabkan aktivasi gen inflamasi. ROS bertanggung jawab atas aktivasi banyak gen inflamasi dan gen yang terlibat dalam penuaan kulit. Mengaktifkan jalur MAP kinase, jalur NF- κ B, dan jalur NFAT.⁷⁰ UVB dapat mengaktifkan jalur sinyal yang terkait dengan reseptor permukaan dengan menyebabkan pengelompokan reseptor, atau dengan memproduksi ROS, yang kemudian mendorong fosforilasi dan aktivasi ERK1/2 dan p38.

Sinar ultraviolet mengaktifkan MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) dengan meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) dalam tubuh, meningkatkan pengaktifan *activator protein-1* (AP-1) (c-Jun dan c-Fos), meningkatkan matriks metalloproteinase (MMPs) dan menurunkan kolagen dan elastin.⁴ Rangsangan eksternal mengaktifkan sinyal MAPK, mengaktifkan nuklir faktor kappa-beta (NF- κ B), dan AP1, peningkatan permeabilitas pembuluh darah, dan kerusakan jaringan melalui masuknya leukosit dengan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan mediator inflamasi lokal.⁷¹ Produksi sitokin dan mediator proinflamasi seperti IL-6.⁷²

Radiasi UVB menginduksi sitokin proinflamasi yang memicu

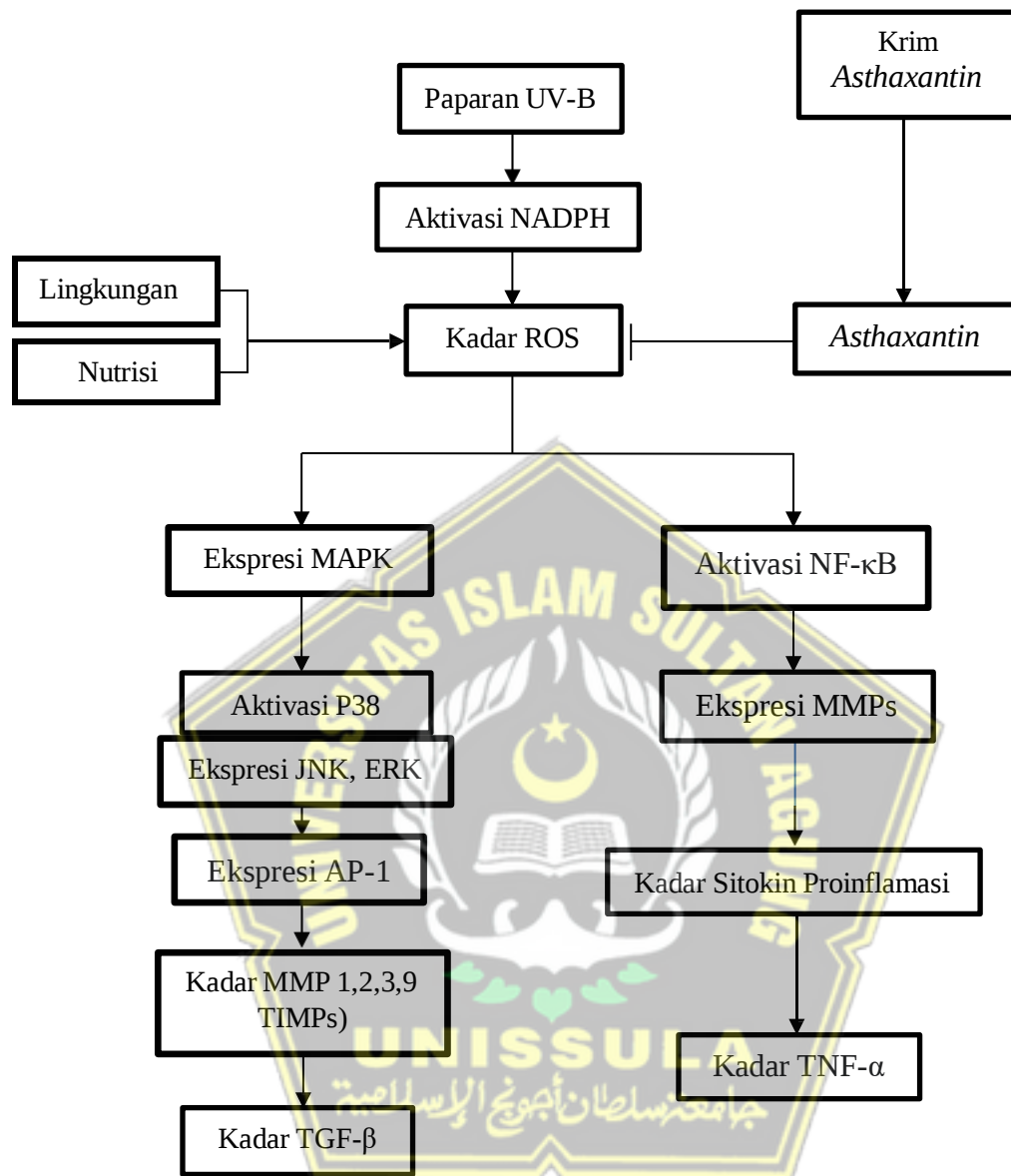
kemotaksis sel inflamasi pada kulit. Sel-sel ini mengeluarkan metalloproteinase (MMPs) dan enzim lain yang merusak matriks kulit.⁷³ Peningkatan regulasi ekspresi dan peradangan MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas, Selain itu, sebagai penghambat alami MMP, penghambat jaringan metalloproteinase (TIMP) mengatur aktivitas MMP, oleh karena itu, tingginya ekspresi MMP pada kulit menjadi penyebab utama hilangnya elastisitas kulit dan terbentuknya kerutan.⁷⁴

Pengikatan sitokin proinflamasi menginduksi homodimerisasi gp130 dan fosforilasi JAKs. Selain itu, transduser sinyal dan aktivator transkripsi (STAT) memainkan peran sentral dalam jalur transduksi sinyal sitokin, terutama melalui STAT3, menginduksi ekspresi mRNA prokolagen melalui fosforilasi JAK, kinase yang diatur sinyal ekstraseluler dan protein kinase yang diaktifkan mitogen, meningkatkan TGF- β , yang merupakan penginduksi kuat produksi kolagen.⁷⁵ Selama fotoaging, produksi TGF- β yang diturunkan dari keratinosit menginduksi fotoinflamasi oleh MMP2 dan MMP9 dan rekrutmen neutrofil. Sementara itu, fibroblas di dermis mengaktifkan sinyal TGF- β /SMAD3 untuk menginduksi respons fibrotik. Efek ini menyebabkan kerusakan fibril kolagen dan pembentukan elastosis surya.⁷⁶

Asthaxantin memiliki kemampuan untuk meningkatkan efek antioksidan dan meningkatkan kemampuan anti penuaan,⁷⁷ menghentikan aktivitas radikal bebas dan menghentikan kerusakan sel,⁵⁶ melindungi terhadap sinar ultraviolet, pigmentasi, mengontrol imunitas, perlindungan antioksidan, dan menahan stres oksidatif, meningkatkan kesehatan kulit dengan mempengaruhi berbagai fase

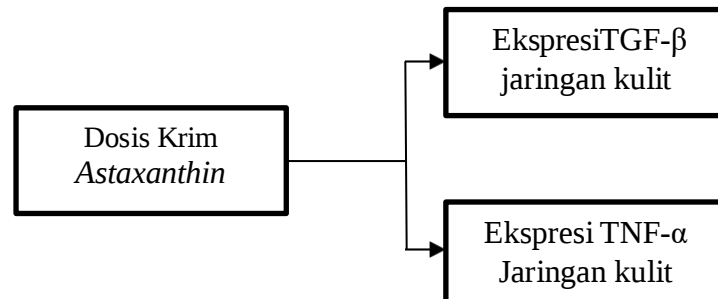
kerusakan oksidatif, pigmentasi dan menekan beberapa mediator inflamasi. *Astaxantin* berkontribusi pada pengurangan kerutan dan penghambatan penuaan akibat sinar matahari.⁵⁷





Gambar 3.1 Kerangka teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

Terdapat pengaruh kadar TGF- β dan TNF- α pada jaringan kulit tikus wistar terpapar sinar UV-B akut yang diberikan krim *Astaxanthin*.

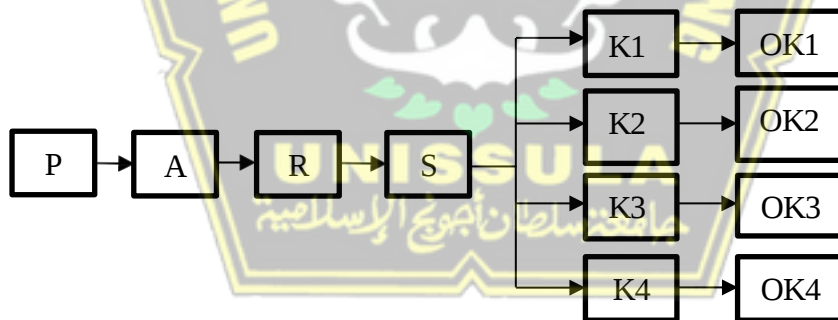


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *Experimental in vivo* dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group* dimana analisis dilakukan setelah perlakuan selesai dilaksanakan, metode rancangan acak menggunakan subjek tikus wistar yang dipapar sinar UVB. Penelitian ini menggunakan subjek tikus berjumlah 28 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat (K1), kelompok kontrol negatif (K2), Kelompok perlakuan krim *Astaxanthin* dosis 0,05% (K3), dan Kelompok perlakuan krim *Astaxanthin* dosis 0,1% (K4), dengan skema sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

- P = Populasi
- A = Adaptasi
- R = Randomisasi
- S = Sampel
- O = Observasi/Pengamatan

- K1 = Kelompok sehat, tikus tanpa perlakuan yang diberikan pakan standar selama 5 hari,
- K2 = Kelompok kontrol negatif, tikus dengan paparan sinar UV-B dan diolesi *base cream* selama 5 hari,
- K3 = Kelompok perlakuan 1, tikus dengan paparan sinar UV-B dan diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05% selama 5 hari,
- K4 = Kelompok perlakuan 2, tikus dengan paparan sinar UV-B dan diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,1% selama 5 hari,

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus galur wistar jantan berusia 2-3 bulan, dengan berat 200-250gram, tikus memenuhi syarat untuk dilakukan penelitian, dipelihara di ruangan dengan ventilasi baik, pada suhu ruang berkisar 22-24°C di laboratorium dan diberi pakan normal. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasi dalam kandang selama 7 hari.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah tikus wistar yang dipapar sinar UVB dengan kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi.

a) Kriteria inklusi

Tikus aktif dan tidak terdapat kelainan anatomis pada tubuh.

b) Kriteria *drop out*

Tikus yang sakit atau mati selama masa penelitian.

4.3 Besar Sampel

Jumlah tikus yang menjadi subjek dalam penelitian ini ditentukan dengan hitungan berdasarkan rumus sampel eksperimen dari Federer.⁷⁸ $(n-1)(t-1) \geq 15$, (n)=jumlah pengulangan, (t)=jumlah kelompok, dengan hasil $n \geq 5$. Kelompok terdiri dari 6 tikus, sampel diambil dari populasi berjumlah 28 ekor tikus wistar,

Total Kelompok : 4 kelompok (t =)

Jumlah tiap kelompok : $(n-1)(t-1) \geq 15$

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 3 \geq 15$$

$$3 \times 3 \geq 15$$

$$n \geq (15+3)/3$$

$$n \geq 6$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus didapatkan jumlah tikus 6 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 6 ekor tikus perkelompok. Setiap kelompok ditambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan apabila ada sampel yang *drop out*, dengan total keseluruhan berjumlah 28 ekor tikus wistar.

4.4 Variabel dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

a) Variabel bebas

Krim *asthaxantin* dosis 0,05% dan 0,1%

b) Variabel Prakondisi

Tikus wistar yang dipapar sinar UV-B

c) Variabel terikat

Ekspresi TNF- α dan TGF- β .

4.4.2 Definisi Operasional

a) **Krim *Asthaxantin* (*Blakeslea trispora*)**

Krim ekstrak *Asthaxantin* yang diperoleh dari PT. Sigma Alderich dengan no batch sediaan *Asthaxantin* SML0982 yang dibuat sediaan krim dosis 0,05% dan 0,1% di *Integrated Biomedical Laboratories* (IBL) Fakultas Kedokteran UNISSULA. Krim diberikan secara topikal setiap pagi hari pada bagian terpapar UVB dosis 160 mJ/cm²/hari selama 5 hari. Hasil ukur mg dengan skala ordinal.

b) **Ekspresi TGF- β**

Ekspresi TGF- β yang diekspresikan pada jaringan epidermis kulit di hari ke 6 diperiksa dengan metode imunohistokimia menggunakan kit antibodi TGF- β rat pAb merk *abclonal*. Penilaian ekspresi TGF- β dilakukan dengan Mikroskop MD 500 pembesaran 400x pada lima lapangan pandang (sel yang terpapar sinar UVB) kemudian interpretasi hasil dihitung dengan intensitas dari sel-sel keratinosit yang berwarna coklat pada sitoplasma dibanding dengan seluruh sel keratinosit. Sel yang ekspresinya kuat berwarna coklat tua pada sitoplasma, ekspresi sedang berwarna coklat keemasan, ekspresi lemah berwarna coklat muda, dan ekspresi negatif berwarna biru. Satuan ekspresi TGF- β dihitung dari jumlah sel positif dengan metode hot spot dalam 5 lapang pandang. Hasil ukur dengan data rasio.

c) Ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF- α adalah jumlah ekspresi TNF- α pada jaringan kulit bagian epidermis sampel tikus setelah perlakuan dengan paparan UVB dan diberikan krim *Astaxantin*. Jumlah kadar dianalisis dengan metode IHC pada hari ke enam setelah perlakuan. Hasil pengukuran dengan satuan persentase % dan skala ukuran rasio.

Ekspresi TNF- α yang diekspresikan pada jaringan kulit hari ke 6 diperiksa dengan metode imunohistokimia menggunakan kit antibodi TNF- α rat. Penilaian ekspresi TNF- α dilakukan dengan Mikroskop MD 500 pembesaran 400x pada lima lapangan pandang (sel yang terpapar sinar UVB) kemudian interpretasi hasil dihitung dengan intensitas dari sel-sel keratinosit yang berwarna coklat pada sitoplasma dibanding dengan seluruh sel keratinosit. Sel yang ekspresinya kuat berwarna coklat tua pada sitoplasma, ekspresi sedang berwarna coklat keemasan, ekspresi lemah berwarna coklat muda, dan ekspresi negatif berwarna biru. Satuan ekspresi TNF- α dihitung dari jumlah sel positif dengan metode hot spot dalam 5 lapang pandang. Hasil ukur dengan data rasio.

4.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di *Integrated Biomedical Laboratories* (IBL) dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang yang dilakukan pada Oktober - Desember 2024.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat cukur, Box pemaparan, Box pemeliharaan, tempat minum tikus, gunting rambut, centrifuge, mikropipet, tip warna biru 1000 μ L, dan tabung vial 1,5 mL. Sinar UV (panjang gelombang 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², mikroskop, toples pewarna, kaca penutup, dan laptop sebagai instrumen yang digunakan dalam analisis data.

4.6.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Ketamin
- Xylazine
- Etanol
- Aquades
- Kloroform
- Antibodi TGF- β
- Antibodi TNF- α

4.7 Cara Penelitian

4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diperoleh dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.7.2 Pembuatan Sediaan Krim *Astaxanthin*

Pembuatan sediaan krim *Astaxanthin* dilakukan dengan tahapan prosedur sebagai berikut:

- a) Menyiapkan bahan-bahan antara lain asam stearat, *isopropyl palmitate*, setil alkohol, propil paraben dan *sorbitan monostearat*
- b) Bahan dicampur dalam cawan penguap lalu dipanaskan pada suhu 80°C hingga mencair dengan menggunakan waterbath (fase I).
- c) Metil Paraben, larutan sorbitol 70% polisorbat 60 (fase II) dilarutkan dalam aquades yang telah dipanaskan pada suhu 80°C dalam breaker gelas.
- d) Campuran fase air tersebut diaduk hingga larut sempurna menggunakan batang pengaduk. Campuran fase I dan fase II dimasukkan ke dalam alat *homogenizer* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
- e) *Astaxanthin* dimasukkan ke dalam basis tersebut pada suhu 45°C kemudian dibiarkan pada suhu kamar. Krim yang sudah jadi dimasukkan ke dalam wadah.

4.7.3 Pemaparan UVB dan Perlakuan pada Subjek Penelitian

1. Pencukuran bulu pada bagian punggung menggunakan mesin pencukur untuk membuka akses ke kulit. Area yang dicukur memiliki diameter sekitar 1 cm.
2. Selama lima hari, punggung tikus dipapar sinar UV (panjang gelombang 302 nm) selama kurang lebih 15 menit setiap hari dengan dosis eritema minimal (MED) 160 mJ/cm².
3. Kemudian tikus diberi perlakuan secara topikal dengan menggunakan krim *Astaxanthin* pada kelompok K3 diolesi krim

Astaxanthin 0,05% dan kelompok K4 diolesi krim *Astaxanthin* 0,1% masing-masing lama 5 hari,

4.7.4 Pengambilan Sampel Jaringan

Pada hari keenam, semua tikus di terminasi. Sampel jaringan kulit diambil, menggunakan pisau steril pada area kulit yang terkena sinar UVB, jaringan diangkat. Untuk fiksasi, sampel jaringan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung berisi alkohol 70% dan disimpan pada suhu kamar hingga dilakukan prosedur preparasi parafin.

4.7.5 Prosedur Analisa Menggunakan Metode Imunohistokimia

Berikut prosedur analisis dengan metode Imunohistokimia:

1. Pembuatan preparat histologi diawali dari insisi jaringan kulit kemudian difiksasi dalam buffer formalin 10% selama 18 jam, jaringan yang berukuran besar dibelah, jaringan yang telah difiksasi dipotong sempurna dengan ketebalan 2-3 mm.
2. Potongan jaringan dimasukkan dalam tissue casset yang dilabel dan ditutup. Tahap selanjutnya yaitu dehidrasi, *clearing*, impregnasi/ *embedding*, *blocking*, kemudian didinginkan pada lempeng pendingin.
3. Tahap selanjutnya adalah pemotongan dengan Mikrotom, hasil pemotongan berupa pita tipis dimasukkan ke *waterbath* berisi air hangat lalu diambil dengan object glass yang diolesi albumin gliserin. Selanjutnya dilakukan inkubasi semalam di inkubator.
4. Tahap selanjutnya adalah pewarnaan (staining).⁴⁴Prosedur pewarnaan

imunohistokimia diawali dengan memanaskan sediaan yang dilekatkan pada obyek glass yang tercoating *Poly L-Lysine* dalam inkubator suhu 40°C selama 1 jam, kemudian dideparafinasi dengan xilol I, II III masing-masing 3 menit.

5. Sampel kemudian dimasukkan dalam ethanol absolut, alkohol 90%, 80% masing-masing 3 menit. Sampel dimasukkan dalam H²O² 0,5% dalam methanol selama 20 menit. Sampel dilakukan antigen retrieval dengan cara direndam dan dipanaskan dalam *Decloaking Chamber*.
6. Sampel didinginkan pada suhu ruang 30 menit dan dibilas dengan akuades. Sampel direndam dalam Phosphat Buffer Saline selama 3 menit.
7. Slide diletakkan dalam *Moisture Chamber* dan pada sekeliling sediaan diberi pembatas dengan *pap pen*, kemudian ditetesi dengan *background sniper* selama 10 menit.
8. Slide ditetesi antibodi primer (TGF- β dan TNF- α) dan diinkubasi selama 1 jam atau overnight. Selanjutnya slide dicuci dengan Phosphat Buffer Saline selama 3 menit.
9. Slide ditetesi dengan anti bodi sekunder dan diinkubasi selama 30 menit. Slide dicuci dengan Phosphat Buffer Saline selama 3 menit. Slide ditetesi TrekavidinHRP Label dan diinkubasi selama 40 menit. Slide ditetesi DAB dan diinkubasi 2–4 menit (1 ml Betazoid Dab Substrate Buffer ditambah 1–2 tetes DAB Chromogen). Slide dicuci dengan air mengalir 5–7 menit.

10. Selanjutnya di counterstain dengan mayer haematoxilin 2–3 menit.
Slide di rendam dalam Lithum Carbonat jenuh 3 menit. Slide dicuci dengan air mengalir 5-7 menit. Slide didehidrasi dengan alkohol 80%, 96%, alkohol absolut sampai dengan xylol I, II, III masing-masing 3 menit.
11. Tahap selanjutnya yaitu *mounting* menggunakan entellan selanjutnya diamati langsung dibawah mikroskop, ekspresi TGF- β dan TNF- α dianalisis dengan metode Hot Spot.
12. Interpretasi hasil metode Imunohistokimia dengan *Immunoreactive Score* (IRS) dimana kombinasi intensitas pewarnaan dan proporsi area positif, dengan Skala: 0–12 (semakin tinggi, semakin tinggi ekspresi protein).

4.8 Analisa hasil

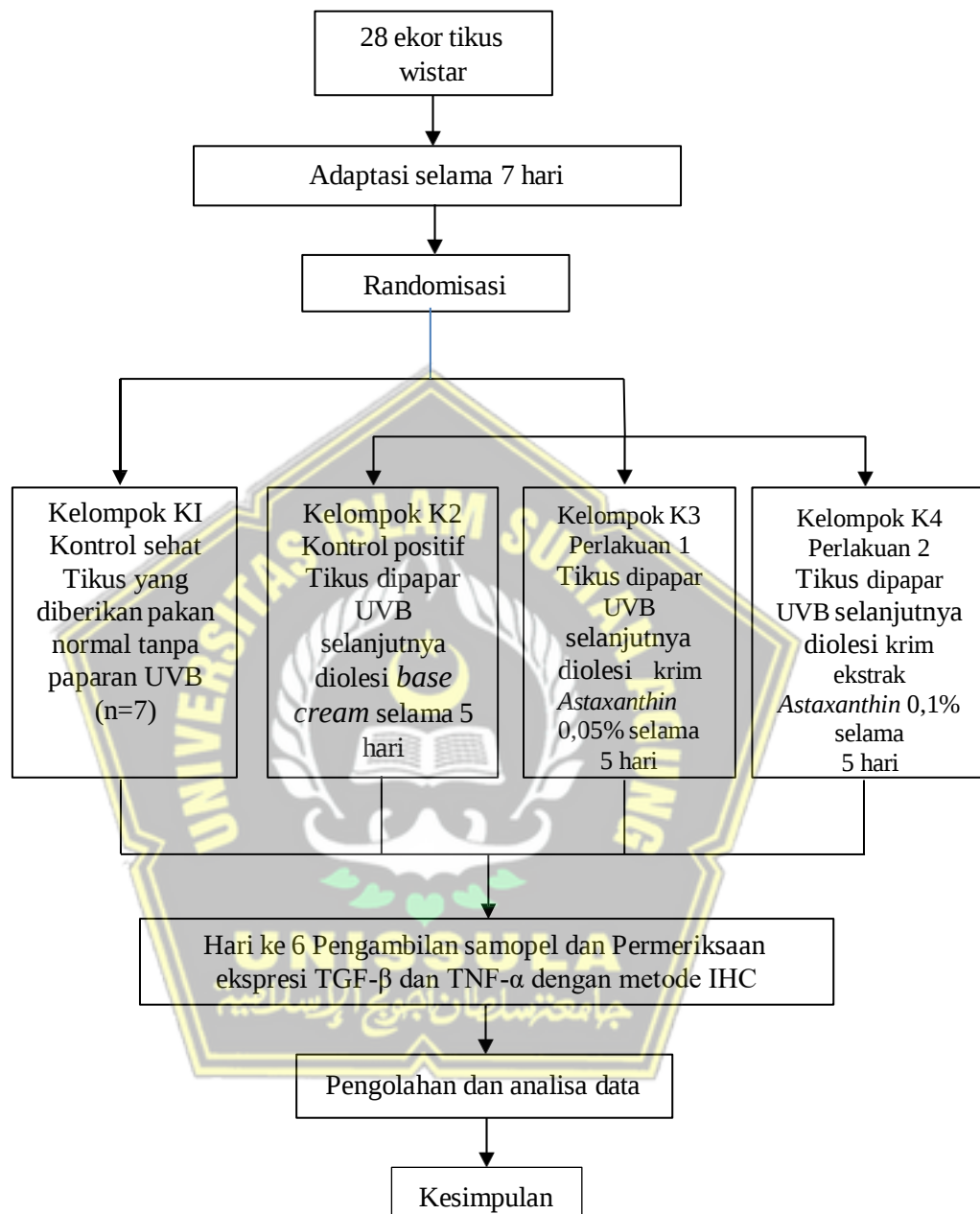
Hasil analisa rata-rata pada penelitian dilakukan uji normalitas data *Shapiro Wilk* (Jumlah sampel < 50) dan uji homogenitas data dengan uji *Levene test*, Hasil uji deskriptif yang data penelitian ekspresi TGF- β dan TNF- α didapatkan tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* untuk melihat perbandingan antar kelompok perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok dosis yang paling berpengaruh. Keputusan untuk diterima atau ditolak hipotesis penelitian berdasarkan α 5 % dan analisa serta olah data menggunakan aplikasi SPSS 27.

4.9 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) dan Laboratorium Patologi Klinik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 2024.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian,

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim astaxanthin terhadap ekspresi TGF- β dan TNF- α pada kulit tikus wistar yang terpapar sinar UV-B akut. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan desain *post-test only control group* yang dilakukan pada bulan Oktober-Desember 2024 di *Integrated Biomedical Laboratories* (IBL), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 28 ekor tikus wistar putih jantan yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Kelompok tikus sehat (K1) tanpa perlakuan yang diberikan pakan standar selama 5 hari, kelompok kontrol negatif (K2) tikus dengan paparan sinar UV-B dan diolesi *base cream* selama 5 hari, kelompok perlakuan 1 (K3) tikus dengan paparan sinar UV-B dan diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05% selama 5 hari, dan kelompok perlakuan 2 (K4) tikus wistar dengan paparan sinar UV-B dan diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,1% selama 5 hari. Setelah perlakuan, pada hari ke 6 sampel jaringan kulit tikus *Wistar* diambil untuk dianalisa ekspresi TGF- β dan TNF- α dengan metode Imunohistokimia dengan *Immunoreactive Score* (IRS) yakni kombinasi intensitas pewarnaan dan proporsi area positif, dengan Skala: 0–12 (semakin tinggi skor, maka semakin tinggi ekspresi protein).

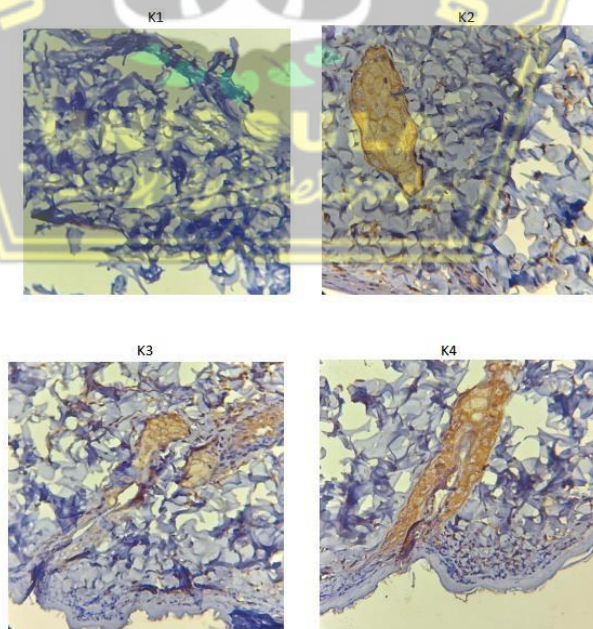
5.1.1 Hasil histologi jaringan kulit dan gamabaran makaroskopis tiap kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil imunohistopatologi, ekspresi $TGF-\beta$ pada jaringan kulit menunjukkan variasi yang signifikan di antara kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol sehat (K1), ekspresi $TGF-\beta$ tercatat paling rendah, yaitu $0,12\% \pm 3,12$. Hal ini menggambarkan kondisi kulit normal tanpa paparan sinar UV-B atau perlakuan apapun, di mana $TGF-\beta$ berada pada level basal yang rendah sesuai fungsi fisiologisnya dalam menjaga homeostasis jaringan kulit. Sebaliknya, kelompok kontrol negatif (K2) yang terpapar sinar UV-B dan hanya diberikan *base cream* menunjukkan peningkatan ekspresi $TGF-\beta$ hingga $7,53 \pm 8,25$. Peningkatan ini mencerminkan adanya respons kulit terhadap kerusakan akibat radiasi UV-B. Pada kondisi stres oksidatif dan peradangan akibat UV-B, $TGF-\beta$ biasanya diaktifkan sebagai bagian dari proses perbaikan jaringan. Namun, ekspresi $TGF-\beta$ yang berlebihan juga dapat mencerminkan proses fibrosis atau jaringan parut yang tidak normal, yang berkontribusi terhadap *photoaging* atau penuaan kulit akibat sinar matahari.

Kelompok perlakuan dengan krim Astaxanthin dosis 0,05(K3) menunjukkan penurunan ekspresi $TGF-\beta$ menjadi $6,57 \pm 0,19$. Sementara itu, kelompok yang diberikan krim Astaxanthin dosis 0,1(K4) menunjukkan ekspresi $TGF-\beta$ yang lebih rendah lagi, yaitu $4,79 \pm 0,15$. Penurunan ini menunjukkan bahwa Astaxanthin berperan aktif dalam mengurangi respon inflamasi dan stres oksidatif yang dipicu oleh paparan sinar UV-B. Efek antioksidan dan anti-inflamasi Astaxanthin dapat

membantu menstabilkan aktivitas sel-sel kulit dan mencegah aktivasi jalur *TGF- β* yang berlebihan.

Penurunan ekspresi *TGF- β* seiring peningkatan dosis Astaxanthin juga menunjukkan adanya efek dosis-respons, di mana semakin tinggi konsentrasi Astaxanthin, semakin kuat efek proteksinya terhadap kulit. Hal ini menunjukkan potensi penggunaan krim Astaxanthin sebagai agen pencegah kerusakan kulit akibat radiasi UV-B, khususnya dalam menghambat mekanisme molekuler yang memicu *photoaging* dan peradangan. Secara keseluruhan, hasil ini mendukung hipotesis bahwa pemberian krim Astaxanthin, terutama pada dosis 0,1, efektif dalam menekan ekspresi *TGF- β* yang berlebihan, menjaga kesehatan kulit, dan mengurangi risiko kerusakan jaringan kulit akibat sinar UV-B akut (Gambar 5.1).



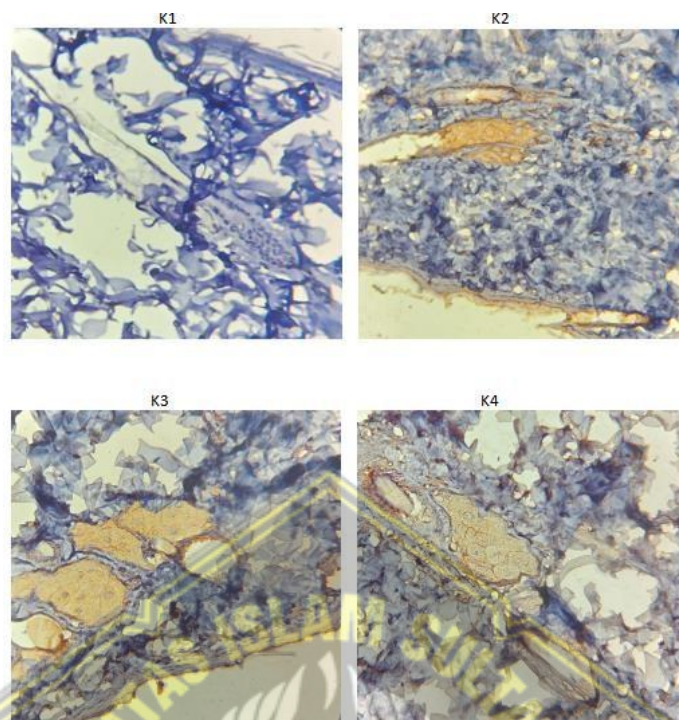
Gambar 5.1 Imunohistopatologi ekspresi *TGF- β*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi *TNF- α* pada jaringan kulit tikus Wistar berbeda secara signifikan antar kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol sehat (K1), rerata ekspresi *TNF- α* sangat rendah, yaitu $0,06 \pm 0,10$, mencerminkan kondisi kulit normal tanpa inflamasi atau stres oksidatif. Kondisi fisiologis ini menunjukkan bahwa *TNF- α* hanya diekspresikan dalam jumlah kecil sebagai bagian dari homeostasis jaringan, dan nilai ini menjadi patokan dasar untuk menilai efek perlakuan lainnya. Kelompok kontrol negatif (K2) yang hanya diberikan *base cream* setelah paparan sinar UV-B menunjukkan peningkatan tajam ekspresi *TNF- α* hingga $7,06 \pm 0,21$. Kenaikan ini mengindikasikan respons inflamasi signifikan akibat radiasi UV-B, di mana sinar UV-B memicu pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan mengaktifkan jalur *Nuclear Factor Kappa B* (*NF- κ B*), sehingga meningkatkan sintesis sitokin pro-inflamasi seperti *TNF- α* . Hal ini berkaitan dengan proses *photoaging* berupa penebalan epidermis, kulit kering, dan munculnya keriput, sebagai akibat dari degradasi matriks ekstraseluler oleh *Matrix Metalloproteinases* (MMPs).

Pada kelompok perlakuan krim Astaxanthin dosis 0,05(K3), ekspresi *TNF- α* menurun menjadi $5,93 \pm 0,24$, menunjukkan efek anti-inflamasi Astaxanthin. Astaxanthin diketahui mampu menekan jalur *NF- κ B* dan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi, sehingga membantu mengurangi kerusakan sel kulit dan memperbaiki kondisinya dibandingkan kelompok K2. Efek lebih kuat terlihat pada kelompok perlakuan krim Astaxanthin dosis 0,1(K4), di mana ekspresi *TNF- α* turun lebih lanjut menjadi $4,90 \pm 0,24$. Penurunan ini menunjukkan

adanya hubungan dosis-respons positif, di mana peningkatan konsentrasi Astaxanthin meningkatkan efektivitasnya dalam menghambat peradangan. Selain itu, Astaxanthin pada dosis ini mungkin juga meningkatkan aktivitas antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD) dan *Glutathione Peroxidase* (GPx), memberikan perlindungan tambahan melalui reduksi radikal bebas dan penghambatan kerusakan kolagen oleh MMPs.

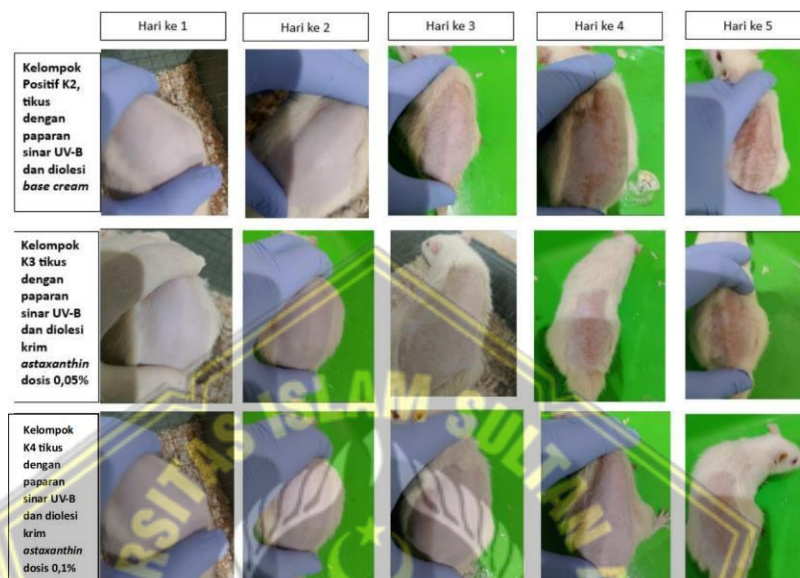
Secara keseluruhan, ekspresi *TNF- α* yang lebih rendah pada kelompok K3 dan K4 dibandingkan kelompok K2 menegaskan efektivitas Astaxanthin sebagai agen anti-inflamasi dan fotoprotektif pada kulit yang terpapar sinar UV-B. Dosis 0,1 terbukti lebih efektif dibandingkan 0,05, menunjukkan pentingnya optimalisasi dosis dalam penggunaan Astaxanthin sebagai krim topikal. Penurunan ekspresi *TNF- α* ini relevan secara klinis karena *TNF- α* tidak hanya berperan dalam inflamasi akut tetapi juga dalam perkembangan penyakit kulit kronis dan *photoaging*. Dengan demikian, Astaxanthin memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai bahan aktif dalam produk dermatologi yang lebih aman dan efektif dalam melindungi kulit dari dampak buruk sinar UV-B.



Gambar 5.2 Imunohistopatologi ekspresi TNF- α

Paparan UVB pada kulit tikus dapat menyebabkan kerusakan seperti eritema, edema, deskuamasi, dan peningkatan tanda-tanda penuaan kulit. Kulit terlihat kemerahan akibat peradangan, pembengkakan di area kulit akibat peningkatan permeabilitas pembuluh darah, pengelupasan kulit terjadi akibat kerusakan epidermis, permukaan kulit menjadi kasar dan kering. Kelompok dengan Krim Astaxanthin menunjukkan warna kemerahan pada kulit berkurang, menandakan efek antiinflamasi astaxanthin, astaxanthin dapat meningkatkan hidrasi kulit dan mencegah pengelupasan berlebihan. Astaxanthin memiliki sifat antioksidan yang kuat, sehingga dapat melindungi kulit dari kerusakan oksidatif akibat UVB dan mempercepat pemulihan kulit. Konsentrasi astaxanthin dalam krim mungkin terlalu rendah untuk memberikan efek terapeutik dalam waktu singkat. Efikasi bahan aktif bergantung pada konsentrasi optimal yang digunakan. Frekuensi pemberian krim

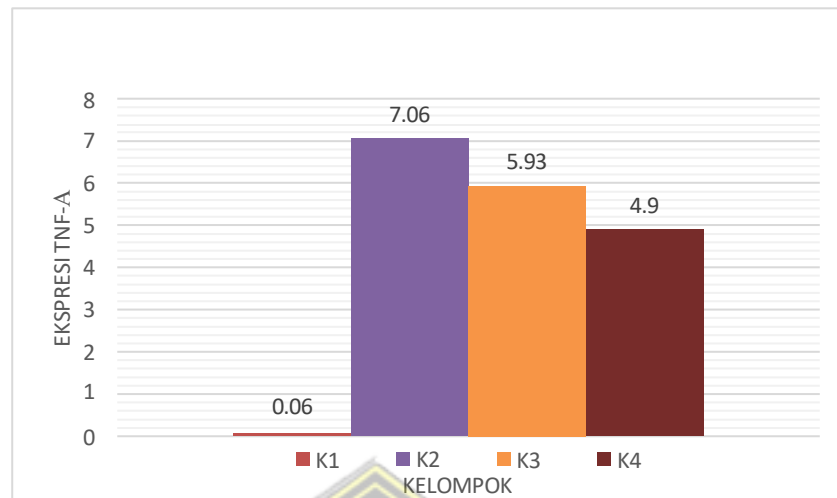
juga berpengaruh. Jika krim hanya diberikan satu kali sehari, efeknya mungkin lebih lambat dibandingkan dengan aplikasi dua kali sehari. Hasil gambaran makroskopis jaringan kulit tikus seperti pada Gambar 5.5.



Gambar 5.3 Makroskopis kulit tikus yang dipapar UVB selama 5 hari antar kelompok

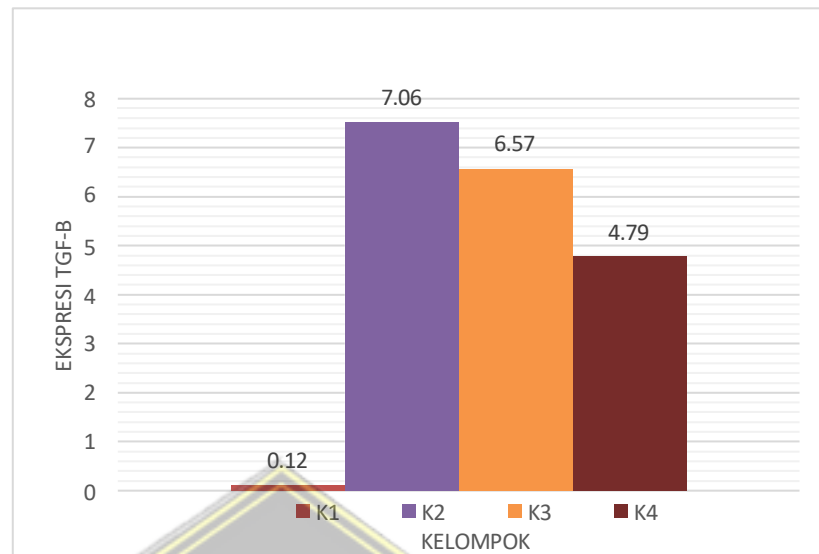
5.1.2 Hasil analisis ekspresi TNF- α dan TGF- β pada tiap kelompok perlakuan

Hasil analisis ekspresi rerata ekspresi TNF- α pada kontrol sehat (K1) adalah yang terendah yaitu $0,06 \pm 0,10$ sedangkan rata-rata ekspresi TNF- α tertinggi pada kelompok positif yaitu $7,06 \pm 0,21$, dari hasil tersebut menunjukkan bahwa paparan sinar UV-B yang diberikan *base cream* menyebabkan tingginya ekspresi TNF- α . Rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok yang dipapar sinar UV-B kemudian diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05(K3) dan 0,1(K4) lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok negatif berturut-turut sebesar $5,93 \pm 0,24$ dan $4,90 \pm 0,24$. Disimpulkan bahwa ekspresi TNF- α lebih rendah pada kelompok K3 dan K4 yang diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05 dan 0,1 berturut-turut sebesar $5,93 \pm 0,24$ dan $4,90 \pm 0,24$ (Gambar 5.2).



Gambar 5.4 Rerata ekspresi TNF- α tiap kelompok

Hasil analisis ekspresi TGF- β pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada gambar 5.1. Rerata ekspresi TGF- β pada kontrol sehat (K1) adalah yang terendah yaitu $0,12 \pm 3,12$ sedangkan rata-rata ekspresi TGF- β lebih tinggi pada kelompok negatif (K2) yaitu $7,5 \pm 8,25$, dari hasil tersebut menunjukkan bahwa paparan sinar UV-B yang diberikan *base cream* lebih tinggi terhadap ekspresi TGF- β . Rerata ekspresi TGF- β pada kelompok yang dipaparan sinar UV-B kemudian diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05 (K3) dan 0,1 (K4) lebih rendah jika dibandingkan kelompok kontrol positif (K2) yaitu $6,57 \pm 0,19$ dan $4,79 \pm 0,15$ (Gambar 5.1). Disimpulkan bahwa ekspresi TGF- β lebih rendah setelah diberikan krim *astaxanthin* dosis 0,05 dan 0,1.



Gambar 5.5 Rerata ekspresi TGF- β tiap kelompok

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas dan homogenitas varian data

Kelompok	Ekspresi TGF- β		Ekspresi TNF- α	
	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas
K1	0,083		0,001	
K2	0,195	0,188	0,001	0,243
K3	0,035		0,003	
K4	0,212		0,101	

Keterangan:

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

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

Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi TGF- β pada kelompok K3 0,035 dan ekspresi TNF- α pada semua kelompok mempunyai distribusi data yang tidak normal ($p > 0,05$). Adapun rerata ekspresi TGF- β dan TNF- α memiliki variasi data yang homogen ($p > 0,05$). Berdasarkan distribusi data yang tidak normal dan varian data yang homogen maka uji statistik yang digunakan adalah uji non parametrik untuk membandingkan rerata ekspresi TGF- β dan TNF- α semua kelompok dengan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antar dua kelompok.

Tabel 5.2 Hasil rerata ekspresi TGF- β dengan uji *Kruskal Wallis*

Kelompok	Rerata $\pm$ SD	<i>p-value</i>
K1	0,12 $\pm$ 0,14	0,000
K2	7,53 $\pm$ 0,37	
K3	6,57 $\pm$ 0,19	
K4	4,79 $\pm$ 0,15	

Keterangan: SD = standar deviasi

Uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai *p* sebesar 0,001 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan rerata ekspresi TGF- β yang bermakna. Kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan tersebut dapat diketahui dari hasil uji *Mann whitney* pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil uji *Mann Whitney* ekspresi TGF- β

Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,004	0,004	0,003
K2	-	-	0,004	0,004
K3	-	-	-	0,003

Keterangan: $p < 0,05$ = beda bermakna

Hasil uji *Mann whitney* menunjukkan bahwa perbedaan rerata ekspresi TGF- β antar dua kelompok. Kelompok perlakuan dengan pemberian krim *astaxanthin* dosis 0,05 dan 0,1 selama 5 hari ekspresi TGF- β lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok dengan pemberian *base cream*. Hasil ini ditegaskan dengan hasil imunohistokimia (IHC), pengamatan dengan metode IHC menggunakan pewarnaan DAB menunjukkan ekspresi TGF- β tervisualisasi warna coklat pada rata-rata kelompok K2 7,53, K3 6,57, dan K4 4,79 (Gambar 5.4).

Tabel 5.4 Hasil uji rerata ekspresi TNF- α dengan uji *Kruskal Wallis*

Kelompok	Rerata $\pm$ SD	<i>p-value</i>
K1	0,06 $\pm$ 0,10	0,000
K2	7,06 $\pm$ 0,21	
K3	5,93 $\pm$ 0,24	
K4	4,90 $\pm$ 0,24	

Keterangan: SD = standar deviasi

Uji *Kruskal Wallis* nilai *p* sebesar 0,001 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α yang bermakna. Perbandingan antar dua kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan tersebut dapat diketahui dari hasil uji *Mann whitney* pada tabel 5.8.

Tabel 5.5 Hasil rerata ekspresi TNF- α dengan uji *Mann whitney*

Kelompok	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,004	0,004	0,003
K2	-	-	0,004	0,004
K3	-	-	-	0,003

Hasil uji *Mann whitney* menunjukkan bahwa perbedaan rata-rata ekspresi TNF- α antar kelompok perlakuan. Kelompok dengan pemberian *base cream* lebih besar rerata ekspresi TNF- α dibandingkan kelompok yang diberikan krim *astaxanthin* dosis 0,05 dan 0,1. Pemberian krim *astaxanthin* dosis 0,05 dan 0,1 selama 5 hari menunjukkan rerata ekspresi TNF- α lebih rendah. Hasil pengamatan IHC menggunakan pewarnaan DAB menunjukkan ekspresi TNF- α lebih rendah pada kelompok K3 5,93, dan K4 5,93 jika dibandingkan kelompok K2 7,06 yang ditandai dengan tervisualisasi warna coklat pada setiap preparat histologi pada setiap kelompok.

5.2 Pembahasan

Paparan sinar UVB memicu penuaan kulit melalui mekanisme molekuler yang kompleks, yang melibatkan perubahan pada ekspresi TGF- β dan TNF- α , meningkatnya produksi ROS di kulit, seperti anion superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil. Stres oksidatif mengaktifkan jalur sinyal molekuler seperti NF- κ B dan AP-1, yang memicu ekspresi gen proinflamasi seperti TNF- α . Peningkatan TNF- α , yang memicu inflamasi, degradasi kolagen, dan elastin, dilepaskan oleh keratinosit, fibroblas, dan sel imun kulit sebagai respons terhadap kerusakan akibat UVB, TNF- α meningkatkan degradasi kolagen melalui enzim MMP, sementara ekspresi TGF- β lebih rendah menghambat produksi kolagen baru. Kombinasi ini menyebabkan akumulasi kerusakan pada matriks dermis.^{48,79,80}

Hasil penelitian menunjukkan rerata ekspresi TGF- β lebih besar pada kontrol negatif (K2) dengan pemberian *base cream*, rerata ekspresi TGF- β lebih kecil pada kelompok yang diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05% dan 0,1% selama 5 hari. Sama halnya dengan rerata ekspresi TNF- α lebih besar pada kontrol negatif dengan pemberian *base cream*, kemudian ekspresi TNF- α lebih rendah pada kelompok yang diolesi krim *astaxanthin* dosis 0,05% dan 0,1% selama 5 hari. Temuan ini mengungkapkan bahwa perlakuan paparan sinar UVB selama 5 hari pada penelitian ini menyebabkan ekspresi TGF- β lebih rendah. Peningkatan ROS yang mengaktifkan jalur NF- κ B dan AP-1 memicu ekspresi sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6. Jalur ini mendukung inflamasi yang menekan aktivitas homeostatik TGF- β di jaringan kulit.⁸¹

Inflamasi yang dipicu UVB juga dapat mengganggu reseptor TGF- β , yang menghambat kemampuan kulit untuk melakukan regenerasi. TGF- β biasanya berfungsi menghambat proliferasi keratinosit berlebih dan menjaga stabilitas jaringan. Namun, paparan UVB menyebabkan kerusakan reseptor TGF- β , mengurangi efektivitasnya. Peningkatan inflamasi yang mengubah fungsi TGF- β dari penekan inflamasi menjadi pendukung mikrolingkungan inflamasi.⁸¹

Astaxanthin sebagai antioksidan yang kuat, telah menunjukkan efek perlindungan terhadap peradangan yang disebabkan oleh sinar UVB dengan memodulasi stres oksidatif dan jalur peradangan, termasuk yang memengaruhi sinyal TGF- β . Paparan sinar UVB dapat menyebabkan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , yang mengganggu keseimbangan TGF- β , mediator penting untuk perbaikan kulit dan fibrosis.^{82,83} *Astaxanthin* mengurangi ROS intraseluler dan produksi TGF- β aktif dalam makrofag, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian menggunakan mikropartikel *astaxanthin* yang dienkapsulasi. Hal ini membantu mengurangi peradangan dan kerusakan oksidatif, secara tidak langsung melindungi jalur reseptor TGF- β dan menjaga homeostasis dalam jaringan kulit. Selain itu, *astaxanthin* menurunkan sitokin inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α pada keratinosit yang terpapar UVB, sehingga mengurangi efek hilir pada fibroblas dan mencegah produksi metaloproteinase matriks (MMP) yang berlebihan, yang berkontribusi terhadap kerusakan kulit.⁸⁴

Optimalisasi formulasi krim *astaxanthin* dengan dosis lebih besar juga perlu dilakukan untuk meningkatkan penetrasi dan stabilitas *astaxanthin*. Penelitian

lanjutan untuk mengamati efek jangka panjang astaxanthin terhadap penuaan kulit atau paparan UV kronis serta perluas penelitian untuk mengeksplorasi efek astaxanthin pada jalur sinyal lain, seperti MAPK atau NF- κ B, yang juga dipengaruhi oleh UVB.

Faktor nutrisi, terutama antioksidan seperti astaxanthin, dan lingkungan yang terkontrol berperan penting dalam memodulasi respons kulit terhadap sinar UV-B. Kombinasi nutrisi yang baik dan perlindungan lingkungan dapat menekan jalur inflamasi (NF- κ B dan AP-1), menurunkan ekspresi TNF- α , serta menjaga fungsi TGF- β . Hal ini mempertegas peran astaxanthin sebagai agen fotoprotektif yang efektif dalam mencegah penuaan kulit akibat paparan sinar UV-B.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Cream astaxanthin memberikan pengaruh pada ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar
- b. Terdapat perbedaan rata-rata ekspresi TGF- β dan TNF- α jaringan kulit tikus wistar yang tidak terpapar sinar UV-B akut.
- c. Rata-rata ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol negatif $7,53\% \pm 8,25$ dan ekspresi TNF- α pada kontrol negatif $7,06\% \pm 0,21$
- d. Rata-rata ekspresi TGF- β pada kelompok yang diberi *astaxanthin* $0,05\%$ $6,57\% \pm 0,19$ dan ekspresi TNF- α $5,93\% \pm 0,24$
- e. Rata-rata ekspresi TGF- β pada kelompok kelompok yang diberi *astaxanthin* $0,01\%$ $4,79\% \pm 0,15$ dan ekspresi TNF- α $4,90 \pm 0,24$
- f. Terdapat perbedaan rata-rata ekspresi TGF- β yang signifikan antara kelompok K1 dan K2, K3, K4, K2 dan K3, K4 dan terdapat perbedaan rerata kadar TNF- α yang signifikan antara K1 dan K2, K3, K4 ($p=0,004$) serta antara K1 dan K3 ($p=0,004$), K1 dan K3, K4.

6.1. Saran

1. Menggunakan formulasi krim *astaxanthin* dengan dosis lebih besar untuk meningkatkan penetrasi dan stabilitas *astaxanthin*.
2. Melakukan perlakuan pada subjek tikus lebih lama untuk melihat efek jangka panjang *astaxanthin* terhadap paparan UV kronis.
3. Melakukan perlakuan pada subjek menggunakan kontrol positif.

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. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015;31(2):65-74. doi:10.1111/phpp.12145.
3. 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.
4. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6). doi:10.3390/nu11061341.
5. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan: Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. JKK. 2017;4(1):39-48.
6. Kong R, Cui Y, Fisher GJ, et al. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin. *J Cosmet Dermatol*. 2016.
7. Wulan Dhari, Ali Napiyah Nasution, Djohan, et al. Test the Effectiveness of Carrot Tuber Ethanol Extract Cream Preparation Formulation in Preventing Increased Melanin in Male Wistar Rats Exposed to UVB Light. *Jurnal Multidisiplin Madani*. 2023;3(6):1290-1311. doi:10.55927/mudima.v3i6.3535.
8. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2016;55(1):1-19. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.010.
9. Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci*. 2016;7. doi:10.3389/fpls.2016.00531.
10. Singh KN, Patil S, Barkate H. Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(1):22-27. doi:10.1111/jocd.13019.
11. Cavinato M, Koziel R, Romani N, et al. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(5):632-639. doi:10.1093/gerona/glw150.
12. Setiabudi J, Wardhana M, Indira NMDP. Profil Pra Kanker dan Kanker Kulit RSUP Sanglah Periode 2015 - 2018. *Jurnal Medika Udayana*. 2021;10(3):83-89.
13. Liu Y, Huang X, Wang P, et al. The effects of HSP27 against UVB-induced photoaging in rat skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;512(3):435-440. doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.076.
14. Estebansari F, Dastoorpoor M, Khalifehkandi ZR, et al. The Concept of Successful Aging: A Review Article. *Curr Aging Sci*. 2019;13(1):4-10.

- doi:10.2174/1874609812666191023130117.
15. Zouboulis CC, Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Elewa R, Makrantonaki E. Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. *Clin Dermatol.* 2019;37(4):365-372. doi:10.1016/j.clindermatol.2019.04.002.
 16. Nurdianti L, Asriana Sari D, Yulianti R. Formulation and Evaluation of Astaxanthin Lotions as Natural Antioxidants for the Skin. 2018.
 17. Zakaria NNA, Zamzurie NA, Harith ZT. Evaluation of sunscreen cream incorporated with astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in different storage conditions. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021;756. doi:10.1088/1755-1315/756/1/012078.
 18. Ong KS, Liem ZST, Setiawan B. Roles of Telomeres and Telomerase in Aging. 2019;46(4):287-290.
 19. Han SH, Ballinger E, Choung SY, Kwon JY. Anti-Photoaging Effect of Hydrolysates from Pacific Whiting Skin via MAPK/AP-1, NF- κ B, TGF- β /Smad, and Nrf-2/HO-1 Signaling Pathway in UVB-Induced Human Dermal Fibroblasts. *Mar Drugs.* 2022;20(5):1-15. doi:10.3390/md20050308.
 20. Shah H, Rawal Mahajan S. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomed Aging Pathol.* 2013;3(3):161-169. doi:10.1016/j.biomag.2013.05.003.
 21. Pereira LDP, Mota MRL, Brizeno LAC, et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . *J Ethnopharmacol.* 2016;187:213-223. doi:10.1016/j.jep.2016.04.043.
 22. Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other nutrients from *haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Mar Drugs.* 2020;18(9). doi:10.3390/md18090459.
 23. Hagavane S, Sonawane S, Katkale A, Kunde V. Review on cream as topical drug delivery system. *Int J Res Pharm Pharm Sci.* 2022;7(1):21-30.
 24. Wilianto, Linawati NM, Pangkahila W, et al. The Addition of Astaxanthin 0.5% in Sunscreen SPF 50 Inhibits the Increase of Sunburn Cells in Rats Induced By Ultraviolet Light B. *Eur J Biomed Res.* 2024;3(1):17-20. doi:10.24018/ejbiomed.2024.3.1.84.
 25. Setyanto B, Murlistyarini S, Florensia D. Effectiveness of 0.1% Retinol Serum and Astaxanthin Gel on Skin Photoaging. *J Kedokteran Brawijaya.* 2022;32(2):59-66. doi:10.21776/ub.jkb.2022.032.01.12.
 26. Suganuma K, Nakajima H, Ohtsuki M, Imokawa G. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2018;58(2):136-142. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.02.009
 27. Chalyk NE, Klochkov VA, Bandaletova TY, Kyle NH, Petyaev IM. Continuous astaxanthin intake reduces oxidative stress and reverses age-related morphological changes of residual skin surface components in middle-aged volunteers. *Nutrition Research.* 2017;48:40-48. doi:10.1016/j.nutres.2017.10.006

28. Ito N, Seki S, Ueda F. The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people—a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2018;10(7). doi:10.3390/nu10070817
29. Sitanggang TC. Krim Astaxanthin Mencegah Peningkatan Melanin Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B. *Jurnal Media Sains*. 2019;3(2):71-77.
30. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF- α production in the skin. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):87-91. doi:10.1007/S00403-008-0893-7/FIGURES/4
31. 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. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 2719. 2021;22(5):2719. doi:10.3390/IJMS22052719
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. Kankaanranta H, Ilmarinen P, Zhang X, et al. Tumour necrosis factor- α regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF- κ B and AP-1. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0090298
35. Xia S, Zhang X, Zheng S, et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/8426874
36. Khan N, Ahmed S, Sheraz MA, Anwar Z, Ahmad I. Pharmaceutical based cosmetic serums. In: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. ; 2023:167-210. doi:10.1016/bs.podrm.2022.11.006
37. Davinelli S, Bertoglio JC, Polimeni A, Scapagnini G. Cytoprotective Polyphenols Against Chronological Skin Aging and Cutaneous Photodamage. *Curr Pharm Des*. 2018;24(2):99-105. doi:10.2174/1381612823666171109102426
38. Kawasaki K, Muroyama K, Yamamoto N, Murosaki S. A hot water extract of *Curcuma longa* inhibits adhesion molecule protein expression and monocyte adhesion to TNF- α -stimulated human endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(10):1654-1659. doi:10.1080/09168451.2015.1039480
39. Kalimuthu S, Se-Kwon K. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: Marine bioactive compounds. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):2334-2354. doi:10.3390/ijms14022334
40. Su Y, Zhang Y, Fu H, et al. Physicochemical and Anti-UVB-Induced Skin Inflammatory Properties of *Lacticaseibacillus paracasei* Subsp. *paracasei* SS-01 Strain Exopolysaccharide. *Fermentation*. 2022;8(5):1-12. doi:10.3390/fermentation8050198

41. Yusharyahya SN. Mekanisme Penuaan Kulit sebagai Dasar Pencegahan dan Pengobatan Kulit Menua. *eJournal Kedokteran Indonesia*. 2021;9(2):150. doi:10.23886/ejki.9.49.150
42. Ahmad Z, Damayanti. Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology*. 2018;30(03):208-215. [http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis](http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan%20Kulit%3A%20Patofisiologi%20dan%20Manifestasi%20Klinis)
43. Howe PH, Limper AH. Detection of TGF β in Body Fluids and Tissues. *Transforming Growth Factor-Beta Protocols. From: Methods in Molecular Biology*. 2000;142(15).
44. Ardiyan YN. A Review of Quality Control in Histochemistry and Immunohistochemistry Staining. *Berkala Ilmiah Kedokteran Duta Wacana*. 2020;5(2):74-79. doi:10.21460/bikdw.v5i2.180
45. 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
46. Zhang YE. Non-Smad signaling pathways of the TGF- β family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(2). doi:10.1101/cshperspect.a022129
47. Wang L, Wang HL, Liu TT, Lan HY. TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15). doi:10.3390/ijms22157881
48. 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
49. 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
50. 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
51. González Maglio DH, Paz ML, Leoni J. Sunlight effects on immune system: Is there something else in addition to UV-induced immunosuppression? *Biomed Res Int*. 2016;2016:1934518. doi:10.1155/2016/1934518.
52. Ciężyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet radiation and chronic inflammation: Molecules and mechanisms involved in skin carcinogenesis. *Life*. 2021;11(4):326. doi:10.3390/life11040326.
53. Holman DM, Ding H, Guy GP, Watson M, Hartman AM, Perna FM. Prevalence of sun protection use and sunburn and association of demographic and behavioral characteristics with sunburn among US adults. *JAMA Dermatol*. 2018;154(5):561-568. doi:10.1001/jamadermatol.2018.0028.
54. 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):130. doi:10.3390/cosmetics9060130.

55. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Res.* 2022;71(7-8):817-831. doi:10.1007/s00011-022-01598-8.
56. Nurdianti L, Sari DA, Yulianti R. Formulation and evaluation of astaxanthin lotions as natural antioxidants for the skin. *Int Conf Pharm Res Pract.* 2018;2018:108-115.
57. Singh KN, Patil S, Barkate H. Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(1):22-27. doi:10.1111/jocd.13019.
58. Hayashi M, Ishibashi T, Maoka T. Effect of astaxanthin-rich extract derived from *Paracoccus carotinifaciens* on cognitive function in middle-aged and older individuals. *J Clin Biochem Nutr.* 2018;62(2):195-205. doi:10.3164/jcbs.17-100.
59. Ito N, Saito H, Seki S, Ueda F, Asada T. Erratum: Effects of composite supplement containing astaxanthin and sesamin on cognitive functions in people with mild cognitive impairment: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(2):839. doi:10.3233/JAD-189016.
60. Ito N, Seki S, Ueda F. The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people—a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients.* 2018;10(7):817. doi:10.3390/nu10070817.
61. Ambati RR, Moi PS, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Mar Drugs.* 2014;12(1):128-152. doi:10.3390/md12010128
62. Herawan DQ, Kurnia GS, Sukmawati I, Yuniarsih N. Efektivitas Ketersediaan Pelembab Bahan Alam Dalam Mengatasi Kulit Kering. *Jurnal Health Sains.* 2022;3(7):852-857.
<https://jurnal.healthsains.co.id/index.php/jhs/article/view/529/696>
63. Ahmad A, Arfa FFDH, Asifa NS, Ika ZS, Safna Bina Nusriya, Tasya SN. Characterization and Application of Moisturizer In Skin Treatment: A Review. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists.* 2023;33(4)(4):1602-1613.
64. Kurniawan F, Komariah K, Deni R, Danial M, Sukabumi UM. Online Consumer Review And Viral Marketing Analysis Of Skincare Somethinc Purchase Decisions. *Management Studies and Entrepreneurship Journal.* 2022;3(4):1888-1893. <http://journal.yrpiiku.com/index.php/msej>
65. Meng H, Yin Y, Wu W, et al. Raman spectroscopic analysis of skin penetration and moisturizing effects of Bionics vernix caseosa cream compared with Vaseline. *Technology and Health Care.* 2021;29(S1):S327-S334. doi:10.3233/THC-218030
66. Kunde V, Sonawane S, Katkale A, Hagavane S. Review on Lotion As a Skin Care Products. *Worlds Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2022;11(4):503-519. doi:10.20959/wjpps20224-21601
67. Čoma M, Fröhlichová L, Urban L, et al. Molecular Changes Underlying Hypertrophic Scarring Following Burns Involve Specific Deregulations at All Wound Healing Stages (Inflammation, Proliferation and Maturation). *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):897. doi:10.3390/ijms22020897
68. Xu P, Wu Y, Zhou L, et al. Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing

- by promoting re-epithelialization. *Burns Trauma*. 2020;8. doi:10.1093/burnst/tkaa028
69. Hu Y, Liang D, Li X, et al. The Role of Interleukin-1 in Wound Biology. Part II. *Anesth Analg*. 2017;111(6):1534-1542. doi:10.1213/ANE.0b013e3181f691eb
 70. Shabunin AS, Yudin VE, Dobrovolskaya IP, et al. Composite wound dressing based on chitin/chitosan nanofibers: Processing and biomedical applications. *Cosmetics*. 2019;6(1). doi:10.3390/cosmetics6010006
 71. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatol Venereol*. Published online 2021:37-42. doi:10.1097/JD9.0000000000000068
 72. 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
 73. 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
 74. Xiao Z, Yang S, Chen J, et al. Trehalose against UVB-induced skin photoaging by suppressing MMP expression and enhancing procollagen I synthesis in HaCaT cells. *J Funct Foods*. 2020;74. doi:10.1016/j.jff.2020.104198
 75. Kawaguchi Y. Contribution of interleukin-6 to the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017;2:S6-S12. doi:10.5301/jsrd.5000258
 76. 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
 77. Hu W, Dai D, Li W. Anti-aging effect of Blakeslea trispora powder on adult mice. *Biotechnol Lett*. 2013;35(8):1309-1315. doi:10.1007/s10529-013-1206-6
 78. Federer WT. *Experimental Design Theory And Application*, Third Edition,. Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta. Published online 1977.
 79. Guan LL, Lim HW, Mohammad TF. Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature. *Am J Clin Dermatol*. 2021;22(6):819-828. doi:10.1007/s40257-021-00632-5
 80. 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
 81. Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *J Biochem*. 2015;147(6):781-792. doi:10.1093/jb/mvq043
 82. Tominaga K, Hongo N, Fujishita M, Takahashi Y, Adachi Y. Protective effect of astaxanthin on skin deterioration. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;61(1):33-39. doi:10.3164/jcbrn.17-35
 83. Davinelli S, Nielsen ME, Scapagnini G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. *Nutrients*. 2018;10(4):1-12. doi:10.3390/nu10040522

84. Binatti E, Zoccatelli G, Zanoni F, Donà G, Mainente F, Chignola R. Phagocytosis of Astaxanthin-Loaded Microparticles Modulates TGF β Production and Intracellular ROS Levels in J774A.1 Macrophages. *Mar Drugs*. 2021;19(3):1-16. doi:10.3390/

