

**PENGARUH SERUM EKSTRAK DAUN KELAKAI
(*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd.) TERHADAP
EKSPRESI VEGF DAN IL-6
(Studi Eksperimental Pada Mencit BALB/c Yang Dipapar Sinar
UVB Sub Kronis)**

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



Magister Ilmu Biomedik

**Nedya Ulfadhina
MBK2321010365**

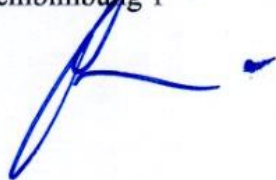
**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2025**

TESIS
PENGARUH SERUM EKSTRAK DAUN KELAKAI
(*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) TERHADAP
EKSPRESI VEGF DAN IL-6
(Studi Eksperimental Pada Mencit BALB/c Yang Dipapar Sinar
UVB Sub Kronis)

Disusun oleh:
Nedya Ulfadhina
MBK2321010365

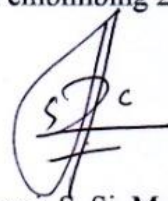
Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Februari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui:

Pembimbing 1



Dr. Dra. Atina Husaana, Msi. Apt
NIK. 210.198.047

Pembimbing 2



Dr. Suparmi, S. Si, M. Si (ERT)
NIK. 210.109.126

Mengetahui,

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



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

PERNYATAAN

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

Semarang, 21 Februari 2025



Nedya Ulfadhina

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena telah memberikan Rahmat kesehatan dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh serum ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd.) terhadap ekspresi VEGF dan IL-6: Studi eksperimental pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB sub kronis” tepat pada waktunya.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh dosen yang telah membantu dan mendukung serta memotivasi penulis dalam penyelesaian penulisan tesis. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
4. Prof. Dr. Dra. Atina Husaana, Msi. Apt selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta motivasi selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. Suparmi, S. Si, M. Si (ERT) selaku Dosen Pembimbing II yang juga memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta motivasi selama penyusunan tesis ini.

6. Prof. Dr. dr. Agung Putra, MSi. Med selaku penguji I yang telah memberikan dukungan dalam penyusunan tesis ini.
7. Prof. Dr. Siti Thomas Z, S.KM, M. Kes selaku penguji II yang memberikan banyak kritik, saran, serta pendapat dalam perbaikan tesis ini.
8. Dr. dr. Hj Chodidjah, M.Kes selaku penguji III yang juga memberikan banyak kritik, saran, serta pendapat dalam perbaikan tesis ini.
9. Orang tua, suami dan anak-anak tercinta yang telah banyak memberikan doa, semangat, dukungan materil maupun immateril sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.
10. Seluruh staf dan pengajar Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah banyak membantu selama penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam penyusunan tesis ini. Saran dan masukan sangat penulis harapkan agar tesis ini dapat menjadi lebih baik. Akhir kata penulis menyampaikan semoga karya sederhana ini dapat bermanfaat untuk semuanya, khususnya bagi perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran.

Semarang, Februari 2025



(Nedya Ulfadhina)

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR ISTILAH	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Originalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	7
1.5.1. Manfaat Teoritis	7
1.5.2. Manfaat Praktis.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Interleukin-6 (IL-6)	9
2.1.1 Pengertian IL-6.....	9
2.1.2 Peran dan Mekanisme kerja IL-6	9
2.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	12
2.2.1 Pengertian VEGF.....	12
2.2.2 Peran dan Mekanisme kerja VEGF	14

2.3 Paparan Sinar Ultraviolet B (UV-B)	16
2.4. Tanaman Kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f) Bedd).....	18
2.4.1. Taksonomi & morfologi tanaman kelakai	19
2.4.3. Fitofarmaka ekstrak daun kelakai.....	20
2.4.2. Kandungan dan manfaat tanaman kelakai	23
2.4.3. Formulasi serum ekstrak daun kelakai	25
2.5. Pengaruh serum ekstrak daun kelakai terhadap ekspresi IL-6 dan VEGF pada kulit mencit yang dipapar sinar UVB subkronis.....	26
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	33
3.1. Kerangka Teori.....	33
3.2. Kerangka Konsep	36
3.3. Hipotesis.....	37
BAB IV METODE PENELITIAN	38
4.1. Jenis dan rancangan penelitian.....	38
4.2. Populasi dan sampel	38
4.2.1. Populasi	38
4.2.2. Sampel.....	39
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	40
4.3.1. Variabel	40
4.3.2. Definisi Operasional.....	41
4.4. Peralat dan bahan.....	42
4.4.1. Alat	42
4.4.2. Bahan.....	42
4.5. Alur penelitian dan tahap pengerjaan	42
4.5.1. Pengajuan izin etik (<i>Ethical clearance</i>).....	42
4.5.2. Penentuan Dosis	43
4.5.3. Pembuatan Ekstrak daun kelakai	43
4.5.4. Penentuan ekspresi Flavonoid dan fenol dari ekstrak daun kelakai	43
4.5.5. Pembuatan Sediaan Serum Ekstrak Daun Kelakai	45
4.5.6. Pengambilan sampel jaringan kulit mencit terpapar UVB	45

4.5.7. Pemeriksaan ekspresi VEGF dan IL-6 menggunakan Metode IHC.....	45
4.6. Analisa Data	47
4.7. Jadwal Pelaksanaanya Penelitian	47
4.8. Alur Penelitian.....	48
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	51
5.1 Hasil Penelitian.....	51
5.1.1 Hasil analisis ekspresi VEGF dan IL-6 jaringan kulit pada setiap kelompok dengan metode imunohistokimia (IHC).	51
5.1.2 Hasil rerata ekspresi VEGF dan IL-6 pada setiap kelompok	57
5.1.3 Ekspresi VEGF jaringan kulit pada setiap kelompok	58
5.1.4 Ekspresi IL-6 jaringan kulit pada setiap kelompok.....	59
5.2 PEMBAHASAN	60
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	66
6.1. Kesimpulan.....	66
6.2. Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN.....	75
1. Lampiran foto dokumentasi penelitian.....	75
2. Lampiran izin etik penelitian.....	76
3. Lampiran Hasil Penelitian.....	77
4. Lampiran pengolahan data dengan SPSS.....	82

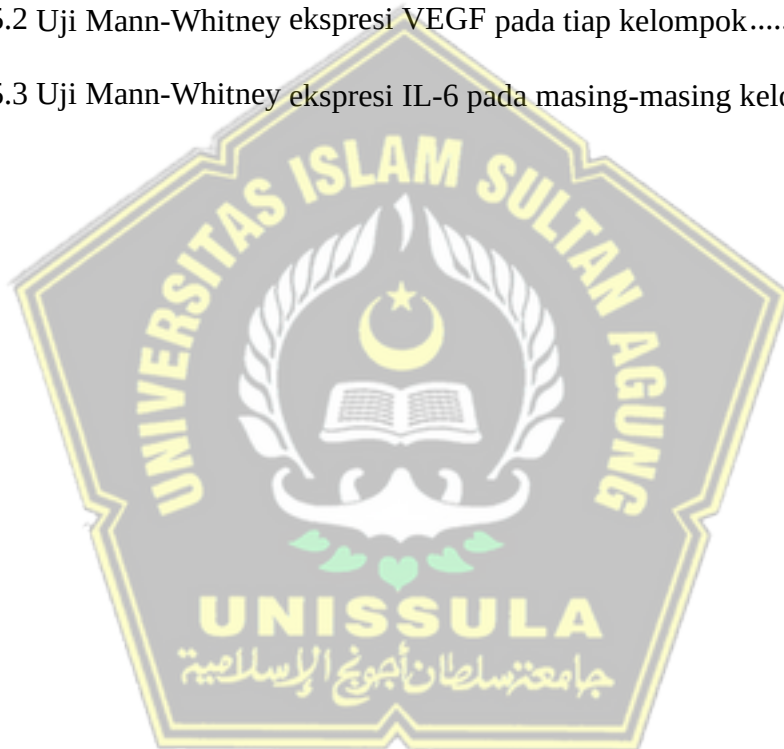
DAFTAR ISTILAH

AP-1	: <i>Activator protein 1</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EG-VEGF	: <i>Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ER- α	: <i>Estrogen receptor alpha</i>
Flk-1	: <i>Fetal liver kinase-1</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HO-1	: <i>Heme oxygenase-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-6R	: <i>Interleukin-6 receptor</i>
KDR	: <i>Kinase insert domain receptor</i>
KGF	: <i>Keratinocyte growth factor</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MMPs	: <i>Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger ribonucleic acid</i>
NF κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NGF	: <i>Nerve growth factor</i>

NP-1	: <i>Neuropilin-1</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PIGF	: <i>Placental growth factor</i>
PKC	: <i>Protein kinase C</i>
PLC γ	: <i>Phospholipase c-gamma</i>
RANKL	: <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RTKs	: <i>Receptor tyrosine kinases</i>
SAA	: <i>Serum amyloid A</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor-beta</i>
TIMP-1	: <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TLRs	: <i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
UVI	: <i>Ultraviolet index</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
α -SMA	: <i>Alpha smooth muscle actin</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 2.1 Hasil uji fitokimia ekstrak daun kelakai.	21
Tabel 2.2 Kandungan antioksidan pada kelakai.....	22
Tabel 5.1 Hasil analisis rerata ekspresi VEGF dan IL-6 jaringan kulit	57
Tabel 5.2 Uji Mann-Whitney ekspresi VEGF pada tiap kelompok.....	59
Tabel 5.3 Uji Mann-Whitney ekspresi IL-6 pada masing-masing kelompok.....	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pensinyalan VEGF.	14
Gambar 2.2 Mekanisme Aktivasi VEGF.	17
Gambar 2.3 Daun kelakai.....	20
Gambar 3.1 Skema kerangka teori.....	36
Gambar 3.2 Kerangka Teori.....	36
Gambar 4.1 Skema sampel penelitian.....	39
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	48



ABSTRAK

Latar Belakang: Peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) akibat paparan UVB menyebabkan aktivasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *interleukin-6* (IL-6). Daun kelakai memiliki antioksidan yang dapat mencegah penuaan kulit akibat sinar UVB. Penelitian ini dilakukan untuk melihat apakah serum dari ekstrak daun kelakai dapat mempengaruhi kadar VEGF dan IL-6 pada kulit mencit yang terkena sinar UVB.

Metode: Penelitian ini menggunakan desain *post test only control group* dengan 5 kelompok perlakuan pada 30 ekor mencit BALB/c. Kelompok-kelompok tersebut meliputi kontrol sehat (K1), kontrol negatif (K2), kontrol positif (K3), dan dua kelompok perlakuan dengan serum ekstrak daun kelakai dosis 2% (K4) dan 4% (K5). Paparan UVB dan serum diberikan selama 14 hari. Persentase ekspresi VEGF dan IL-6 diamati pada jaringan kulit punggung dengan pewarnaan imunohistokimia.

Hasil: Ekspresi VEGF pada K1 sebesar $0,08 \pm 0,11\%$, K2 sebesar $18,88 \pm 0,27\%$, K3 sebesar $2,68 \pm 0,11\%$, K4 sebesar $5,12 \pm 0,23\%$, dan K5 sebesar $4,40 \pm 0,24\%$. Ekspresi IL-6 pada K1 sebesar $0,08 \pm 0,11\%$, K2 sebesar $17,92 \pm 0,18\%$, K3 sebesar $2,68 \pm 0,11\%$, K4 sebesar $4,92 \pm 0,23\%$, dan K5 sebesar $4,44 \pm 0,26\%$. Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan signifikan pada ekspresi VEGF dan IL-6 ($p < 0,05$). Uji Mann-Whitney menegaskan bahwa ekspresi VEGF dan IL-6 pada kelompok K4 dan K5 lebih rendah dari K2 ($p < 0,05$), tetapi belum setara dengan K3 dan K1.

Kesimpulan: Pemberian serum ekstrak daun kelakai 4% berpengaruh terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada jaringan kulit yang dipapar sinar UVB subkronis selama 14 hari.

Kata Kunci: antioksidan, IL-6, serum, daun kelakai, VEGF, UVB

ABSTRACT

Background: The increase in reactive oxygen species (ROS) due to UVB exposure leads to the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6). Kelakai leaves have antioxidants that can prevent skin aging due to UVB rays. This study was conducted to see whether serum from kelakai leaf extract can affect VEGF and IL-6 levels in the skin of mice exposed to UVB rays.

Methods: This study used a post-test only control group design with 5 treatment groups in 30 BALB/c mice. These groups include healthy controls (K1), negative controls (K2), positive controls (K3), and two treatment groups with kelakai leaf extract serum doses of 2% (K4) and 4% (K5). UVB exposure and serum application were conducted for 14 days. VEGF and IL-6 expression percentage was observed in dorsal skin tissue using immunohistochemical staining.

Results: VEGF expression was $0.08 \pm 0.11\%$ in K1, $18.88 \pm 0.27\%$ in K2, $2.68 \pm 0.11\%$ in K3, $5.12 \pm 0.23\%$ in K4, and $4.40 \pm 0.24\%$ in K5. IL-6 expression was $0.08 \pm 0.11\%$ in K1, $17.92 \pm 0.18\%$ in K2, $2.68 \pm 0.11\%$ in K3, $4.92 \pm 0.23\%$ in K4, and $4.44 \pm 0.26\%$ in K5. The Kruskal-Wallis test showed significant differences in VEGF and IL-6 expression ($p < 0.05$). The Mann-Whitney test confirmed that VEGF and IL-6 expression in groups K4 and K5 were lower than K2 ($p < 0.05$), but not yet equivalent to K3 and K1.

Conclusion: The administration of kelakai leaf extract serum at a 4% concentration influenced VEGF and IL-6 expression in skin tissue exposed to subchronic UVB radiation for 14 days.

Keywords: antioxiidant, IL-6, serum, daun kelakai, VEGF, UVB

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Paparan UVB terlalu banyak menimbulkan inflamasi sehingga mengganggu fungsi dan struktur kulit.^{1,2} UVB menyebabkan perubahan struktural pada kulit, seperti pemendekan dan penebalan kolagen, kerusakan elastisitas, dan perubahan komposisi kolagen di dermis,³ kulit menjadi keriput, kendur, dan tidak kenyal.⁴ Paparan UVB menyebabkan akumulasi *reactive oxidative stress* (ROS) pada kulit.^{6,7} menginduksi sitokin proinflamasi pada kulit, termasuk *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *interleukin-6* (IL-6) *metalloproteinase* (MMPs),⁵ Oleh karena itu, diperlukan upaya mengurangi kerusakan kulit akibat paparan UVB melalui sumber antioksidan eksogen yang alami, salah satunya dari tanaman obat tradisional. Pemberian antioksidan eksogen berfungsi memperkuat aktivitas antioksidan endogen dari kulit yang secara alami untuk mencegah kerusakan kulit.⁷

Kelakai adalah tanaman asli Kalimantan Selatan yang biasa digunakan masyarakat untuk mengobati masalah kulit, diare, demam, dan sakit lambung,⁸ penyembuhan luka, infeksi, dan diabetes.⁹ Ndusa *et al.* (2020) melaporkan bahwa kandungan fenolik dan flavonoid daun kelakai lebih tinggi dibandingkan dengan bagian batangnya. Ekstrak daun kelakai memiliki kemampuan antioksidan yang sama kuatnya dengan vitamin C, sehingga berpotensi untuk mencegah penuaan kulit akibat sinar UVB. Paramawidhita *et al.* (2022) melaporkan bahwa aktifitas antioksidan krim ekstrak etanol akar kelakai tergolong sangat kuat dengan IC₅₀ sebesar 19,06 ppm. Uji *in vitro* krim ekstrak etanol akar kelakai konsentrasi 350

ppm menghasilkan *sun protection factor* (SPF) sebesar 12, sehingga berpotensi sebagai *sun block* terhadap paparan UVB.¹⁰ Forestryana *et al.* (2020) melaporkan bahwa mikroemulsi gel akar kelakai ekstrak dengan konsentrasi 80 ppm mempunyai nilai SPF sebesar 9,816 dengan nilai transmisi eritema (*persentase ransfer efficiency* (%Te)) sebesar 9,591% dan nilai transmisi pigmentasi (%Tp) sebesar 16,779%. Gel mikroemulsi ekstrak akar kelakai mempunyai efektivitas fotoprotektif sebagai tabir surya kategori *sunblock*.¹¹ Namun, aktifitas antiaging ekstrak etanol daun kelakai dari paparan sinar UVB berdasarkan ekspresi VEGF dan IL-6 belum banyak diteliti.

Kapasitas antioksidan daun kelakai berperan menurunkan stress oksidatif akibat paparan UVB, sehingga menekan produksi sitokin pro-inflamasi IL-6 dan meningkatkan faktor pertumbuhan/ antiinflamasi seperti VEGF.^{12,13}. Ekspresi VEGF menentukan re-epitelisasi, angiogenesis, dan produksi jaringan granulasi selama fase remodeling.¹⁴ Formulasi ekstrak daun kelakai dalam bentuk serum dan potensinya sebagai antiaging pada penelitian *in vivo* belum pernah dilakukan.

Penelitian ini menguji pengaruh serum ekstrak daun kelakai terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit yang dipapar UVB. Serum dipilih karena konsentrasi bahan aktifnya tinggi, penetrasinya dalam, viskositasnya rendah, dan membentuk lapisan tipis di kulit.¹⁵ Berbagai inovasi pembuatan serum kesehatan wajah yang sudah dilakukan antara lain menambahkan sumber antioksidan untuk mengurangi munculnya kerutan dan bintik hitam sekaligus melindungi kulit wajah dari paparan UVB.¹⁶ Penggunaan antioksidan eksogen penting untuk mencegah kerusakan kulit.¹⁷ Saat ini, permintaan konsumen terhadap produk estetika noninvasif

mengalami peningkatan, khususnya produk alami dengan efek samping yang lebih rendah dibandingkan yang tersedia di pasaran. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi alternatif sumber kaya antioksidan untuk serum kecantikan pencegah kerusakan kulit akibat paparan UVB, serta meningkatkan nilai ekonomi daun kelakai.

1.2. Perumusan Masalah

Apakah serum dari ekstrak daun kelakai dapat mempengaruhi kadar VEGF dan IL-6 pada kulit mencit BALB/c yang terkena sinar UVB secara berulang?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan apakah serum dari ekstrak daun kelakai dapat mempengaruhi kadar VEGF dan IL-6 pada kulit mencit BALB/c yang terkena sinar UVB secara berulang.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa serum ekstrak daun kelakai 2% memengaruhi ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit BALB/c yang dipapar UVB subkronis, dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Membuktikan pengaruh serum ekstrak daun kelakai 4% terhadap ekspresi VEGF dan IL6 pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB subkronis dibanding kelompok kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H.2016. ¹²	Potensi Ekstrak Kelakai (<i>Stenochlaena Palustris</i> (Burm. f) Bedd) Terhadap Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alfa</i> (TNF- α) Pada Mencit BALB/c Yang Diinfeksi Plasmodium Berghei ANKA	Eksperimen tal <i>In vivo</i>	Ekstrak kelakai berpotensi menurunkan ekspresi TNF- α pada mencit yang terinfeksi <i>P. berghei</i> ANKA. Hal ini diduga karena kandungan alkaloidnya yang menekan TNF- α dan NO, yang ekspresinya dikendalikan oleh NF- $\kappa\beta$.
Mashuri M, Sihombing LDM, Alfaqihah S, Edyson E, Suhartono E.2019. ¹⁸	<i>Kelakai Extract Protects Skin from UV-Induced Oxidative Damage</i>	Eksperimen tal	Ekstrak kelakai mempengaruhi aktivitas superoksida dismutase, ekspresi anion superoksida, ekspresi karbonil, dan diena terkonjugasi pada kulit tikus yang dipapar sinar UV. Pengikatan anion superoksida oleh radikal flavonoid reaktif mengurangi kerusakan yang terjadi pada protein dan lipid, sehingga menurunkan ekspresi senyawa karbonil dan diena terkojugasi.
Forestryana D, Putri AN, Liani NA,2020. ¹¹	Pengembangan Formula Masker Gel Peel Off Ekstrak Etanol 70% Akar Kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burn. F) Bedd.).	Eksperimen tal	Formula A3 dengan PVA 16% dipilih sebagai formula optimum karena unggul dalam organoleptik, viskositas, daya sebar, pH, dan waktu pengeringan. Formula ini juga stabil setelah uji <i>freeze thaw</i> .
Paramawidhita RY, Adawiyah R,2021. ¹⁹	Efektifitas Sun Protection Factor Secara <i>In Vitro</i> Sediaan Krim Ekstra Etanol Akar Kelakai	Eksperimen tal <i>In vitro</i>	Ekstrak Etanol Akar Kelakai terbukti memiliki antioksidan yang sangat kuat dan memiliki nilai SPF tinggi, formula I (1%) dan formula II (2%) ekstrak etanol akar kelakai emulgel memenuhi parameter mutu

	(<i>Stenochlaena palustris</i> Bedd) Asal Kalimantan Tengah		uji organoleptik, pH dan uji daya sebar.
Hendra R, Khodijah R, Almurdani M, et al.2022. ⁹	<i>Free Radical Scavenging, Anti-Infectious, and Toxicity Activities from Stenochlaena palustris</i> (Burm.f.) Bedd. <i>Extracts</i> .	Eksperimental <i>In vivo</i>	Ekstrak <i>S. palustris</i> memiliki aktivitas antioksidan dan antiplasmodial yang menjanjikan. Ekstrak diklorometana dan etil asetat menunjukkan tingkat aktivitas antiplasmodial dan pembasmi radikal yang signifikan. Sebaliknya, aktivitas antibakteri dari ekstrak hanya menunjukkan tingkat aktivitas yang lemah terhadap bakteri pathogen.
Pramadiyani N, Darsono PV, Audina M.(2023). ²⁰	Aktivitas Antibakteri dan Formulasi Serum Ekstrak Etanol Daun Kelakai (<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f) Bedd.) Terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> .	Eksperimental <i>In vitro</i>	Ekstrak etanol daun kelakai efektif melawan <i>Propionibacterium acnes</i> , dengan KHM dan KBM sebesar 5% atau 1 gram.

Penelitian sebelumnya pada mencit BALB/c menunjukkan bahwa ekstrak daun kelakai yang dibuat dengan etanol memiliki kemampuan antioksidan yang kuat. Peneliti mengamati ekspresi anion superoksida dan aktivitas enzim superoksida dismutase diukur dengan metode Misra dan Fridovich, ekspresi karbonil diukur dengan metode dinitrofenilhidrazin (DNPH) termodifikasi, dan ekspresi diena terkonjugasi diukur dengan metode Kwiat Kowska.¹⁸ Berbeda dengan penelitian ini yang membuat formulasi serum dari ekstrak daun kelakai terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB sub kronis selama 14 hari.

Jumlah VEGF dan IL-6 dalam kulit mencit BALB/c diukur dengan metode imunohistokimia (IHC).

Penelitian lainnya meneliti ekstrak etil asetat dari daun kelakai terhadap aktivitas penangkal radikal bebas, aktivitas antiplasmodial, toksisitas, dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen. Kemampuan ekstrak untuk melawan radikal bebas diuji dengan menggunakan DPPH dan NO. Uji antiplasmodial dan toksisitas dilakukan menggunakan dua galur *Plasmodium falciparum* (3D7 dan W2) dan uji letalitas udang air asin. Selain itu, aktivitas antibakteri ditentukan menggunakan metode difusi sumur. Berbeda dengan penelitian ini yang menggunakan ekstrak daun kelakai yang dibuat sediaan serum terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB sub kronis selama 14 hari.⁹

Peneliti terdahulu melakukan formulasi emulgel ekstrak etanol akar kalakai pada konsentrasi 1% dan 2% dan uji tahap awal evaluasi fisik sediaan berdasarkan uji organoleptik, pH dan daya sebar sediaan.¹⁹ Penelitian ini menggunakan serum dari daun kelakai, berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan gel dari akar kelakai. Penelitian sebelumnya mengukur kemampuan gel dalam melindungi kulit dari sinar UV dengan alat khusus.¹¹ Berbeda dengan penelitian ini yang menggunakan ekstrak daun kelakai yang dibuat sediaan serum terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB sub kronis selama 14 hari.

Penelitian sebelumnya menguji apakah ekstrak daun kelakai dapat menurunkan kadar TNF- α pada mencit yang terinfeksi malaria. Mencit diberi perlakuan selama empat hari, lalu darahnya diambil untuk mengukur kadar TNF- α

menggunakan metode *sandwich ELISA*.¹² Penelitian ini menggunakan serum ekstrak daun kelakai dan analisis imunohistokimia (IHC) pada jaringan kulit mencit yang dipapar UVB selama 14 hari, berbeda dengan penelitian sebelumnya.

Penelitian sebelumnya menguji kemampuan ekstrak daun kelakai dalam melawan bakteri penyebab jerawat dan membuat serumnya. Penelitian ini berbeda karena menggunakan serum tersebut untuk melihat pengaruhnya pada kadar VEGF dan IL-6 di kulit mencit yang terkena sinar UVB, dengan metode imunohistokimia (IHC).

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Secara teori penelitian ini dapat memberikan pengetahuan tentang manfaat serum ekstrak daun kelakai terhadap ekspresi VEGF dan IL-6 pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB

1.5.2. Manfaat Praktis

Mendorong pemanfaatan daun kelakai sebagai bahan alami sediaan serum untuk mencegah penuaan kulit dini akibat paparan UVB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Interleukin-6 (IL-6)

2.1.1 Pengertian IL-6

Sitokin adalah molekul yang dibuat oleh sel untuk mengirim pesan ke sel lain atau ke dirinya sendiri. Sitokin dari monosit disebut monokin, dan dari limfosit disebut limfokin.²¹ IL-6 adalah zat yang memicu peradangan dan membantu mengaktifkan sel-sel kekebalan tubuh. IL-6 juga berperan penting dalam respons tubuh terhadap cedera, infeksi, atau operasi. Kadar IL-6 dalam darah meningkat dengan cepat setelah cedera dan bertahan selama beberapa hari, sehingga dapat digunakan untuk mengukur tingkat kerusakan sel akibat peradangan.²²

IL-6 menginduksi respons seluler melalui pengikatan pada IL-6R dan aktivasi gp130. Sel yang tidak memiliki membran IL-6R dapat merespons IL-6 melalui kompleks IL-6/IL-6R terlarut yang juga mengaktifkan gp130.²³

2.1.2 Peran dan Mekanisme kerja IL-6

IL-6 sangat penting dalam peradangan akut. IL-6 dilepaskan segera setelah cedera dan memicu sel-sel di sekitarnya untuk mengeluarkan zat-zat kimia yang menyebabkan peradangan. IL-6 juga membantu sel-sel darah putih bergerak ke tempat luka.²⁴ TLRs mengaktifkan jalur sinyal, termasuk NF κ B, yang meningkatkan produksi mRNA sitokin proinflamasi (IL-6, TNF- α , IL-1b). TNF- α dan IL-1b kemudian memicu produksi IL-6 melalui aktivasi faktor transkripsi.²⁵

IL-6 berperan dalam melindungi jaringan dari kerusakan pada inflamasi non-infeksi. Peningkatan IL-6 serum mendahului perubahan suhu dan ekspresi protein fase akut. DAMPs dari sel rusak memicu inflamasi.²⁶ IL-6 dibuat dengan cepat saat tubuh mengalami infeksi atau cedera. IL-6 membantu tubuh membuat sel darah baru, mengaktifkan sistem kekebalan tubuh, dan memicu respons tubuh terhadap cedera, sehingga membantu tubuh bertahan.²⁷ IL-6, yang diproduksi di lokasi peradangan awal, merangsang hati untuk memproduksi protein fase akut seperti CRP, SAA, fibrinogen, haptoglobin, dan alpha 1-antichymotrypsin melalui sirkulasi darah.²⁸

IL-6, zat yang memicu peradangan, dibuat oleh tubuh ketika ada infeksi atau cedera. IL-6 membantu sistem kekebalan tubuh, baik yang langsung bereaksi maupun yang belajar mengenali penyakit. Sel imun bawaan, seperti makrofag, melepaskan IL-6 sebagai bagian dari mekanisme pertahanan inang untuk memberantas sel yang terinfeksi atau jaringan rusak, DAMPs atau PAMPs memicu produksi IL-6. Produksi IL-6 yang berlebihan dapat menyebabkan peradangan kronis.²⁹ IL-6, mediator inflamasi, diproduksi oleh sel imun (monosit, makrofag) dan non-imun (fibroblas, sel mesenkim, endotel vaskular) selama inflamasi akut sebagai respons terhadap PAMPs/DAMPs atau rangsangan lainnya.²⁹

Pada respons awal terhadap cedera, IL-6 memicu produksi sitokin proinflamasi dari berbagai sel dan menginduksi kemotaksis leukosit ke area luka.³⁰ IL-6 membantu tubuh memperbaiki jaringan saat peradangan

memburuk. Jika sinyal peradangan tidak tepat, luka akan lebih lama sembuh dan mudah terinfeksi.³¹

Trans-sinyal IL-6 melalui sIL-6R/IL-6 dan gp130 mengaktifkan jalur JAK/STAT dan MAPK, yang merangsang migrasi fibroblas. Fibroblas memproduksi kolagen dan fibronectin untuk epitelisasi. IL-6 juga memicu interaksi profibrotik fibroblas/keratinosit: induksi IL-6 pada produksi sitokin proinflamasi pada makrofag/monosit terjadi melalui jalur pensinyalan MAPK dan NFkB. Ketika terkena IL-6, monosit dan makrofag melepaskan IL-1 β dan TNF- α , yang membuat fibroblas memproduksi KGF. KGF membantu keratinosit tumbuh dan berpindah. Keratinosit kemudian membuat oncostatin M, yang mengirim sinyal ke fibroblas untuk membantu memperbaiki jaringan.³²

IL-6 mengatur polarisasi makrofag M2, penting untuk perbaikan luka akhir, melalui peningkatan regulasi reseptor IL-4. Sel M2 mengekspresikan TGF- β dan IL-10, yang anti-inflamasi. TGF- β mengaktifkan kolagen-I pada fibroblas, memfasilitasi deposisi ECM, dan menghambat degradasi ECM. Penutupan luka memerlukan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas (α -SMA). IL-6 mengatur diferensiasi ini melalui TGF- β dan jalur JAK/ERK.³²

Ketidakseimbangan makrofag, dengan dominasi M1, dapat menghambat penyembuhan luka kulit melalui peningkatan produksi IL-6 akibat peradangan yang berkelanjutan. IL-6 mengatur polarisasi M2 dengan

menginduksi produksi IL-4 sel Th2 dan IL-4R pada makrofag. Makrofag M2 khususnya adalah sekretor utama sitokin proliferasi VEGF dan TGF- β .³³

Pada kondisi kulit yang mengalami fibrosis, terdapat interaksi antara IL-6 dan TGF- β yang membuat sel fibroblas terus memproduksi keduanya. IL-17A membantu pembentukan kolagen dan perubahan fibroblas menjadi sel yang menyatukan luka. Pembentukan pembuluh darah baru sangat penting untuk fibrosis, dan IL-6 membantu proses ini dengan membuat miofibroblas bertahan hidup dan meningkatkan produksi VEGF.³³

IL-6, sitokin pleiotropik, menginduksi protein fase akut (CRP, serum amiloid A, fibrinogen, hepcidin) dan menghambat albumin di hepatosit. IL-6 juga berperan dalam imunitas adaptif, diferensiasi sel non-imun, dan dapat menyebabkan penyakit jika produksinya tidak terkontrol. Molekul dan sel terkait: Treg, RANKL, aktivator NF- κ B, VEGF.³⁴

2.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

2.2.1 Pengertian VEGF

VEGF merupakan protein sinyal alami yang bertindak sebagai agen kemotaksis, pengatur angiogenesis dan vaskulogenesis, serta mitogen untuk sel endotel. VEGF, sebagai faktor angiogenesis yang kuat, menyebabkan berbagai kelainan patologis, termasuk preeklamsia, retinopati diabetik, degenerasi makula, proses inflamasi dan iskemik, pertumbuhan dan metastasis tumor. VEGF diproduksi sejak pasca kelahiran dan berperan dalam limfangiogenesis. Gen VEGF terletak di kromosom 6p21.3, bagian dari superfamili faktor

pertumbuhan simpul sistin. VEGF adalah glikoprotein heterodimerik 40 kDa dengan motif simpul sistin, mirip dengan PDGF, NGF, dan TGF- β .^{35,36} EG-VEGF terdiri dari VEGF-A hingga VEGF-F dan PlGF. Dari semua jenis tersebut, VEGF-A adalah yang paling efektif dalam mendorong angiogenesis.³⁷

VEGF-A, dengan delapan ekson dan tujuh intron, menghasilkan berbagai isoform melalui penyambungan mRNA. VEGF-A berperan dalam vaskulogenesis dan neoangiogenesis dengan memicu proliferasi sel, menghambat apoptosis, meningkatkan permeabilitas kapiler, vasodilatasi, dan menarik sel inflamasi ke area cedera. VEGFR-1 memiliki afinitas 10x lebih tinggi terhadap isoform VEGF tertentu dibandingkan VEGFR-2. Sel tumor, makrofag, dan berbagai sel lainnya melepaskan VEGF saat kekurangan oksigen.^{32,33}

VEGF-B, ditemukan pada 1995, diekspresikan sejak perkembangan awal dan terdapat di berbagai organ dewasa. Isoform VEGF-B167 dan VEGF-B186, dihasilkan melalui penyambungan gen alternatif, berikatan dengan VEGFR-1. Meski tidak signifikan dalam vaskulogenesis, VEGF-B penting untuk perkembangan kardiovaskular dan miokardium embrionik.³⁸

VEGF-C, dominan pada limfangiogenesis embrionik dan organ dewasa tertentu, berikatan dengan VEGFR-3 (tinggi) dan VEGFR-2 (rendah). VEGF-D, mirip VEGF-C, berikatan dengan VEGFR-3 dan NP-2, berperan dalam limfangiogenesis, bukan angiogenesis. VEGF-E, VEGF virus, meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan berikatan dengan VEGFR-2.^{39,40}

PlGF, faktor pertumbuhan plasenta, berperan dalam perkembangan

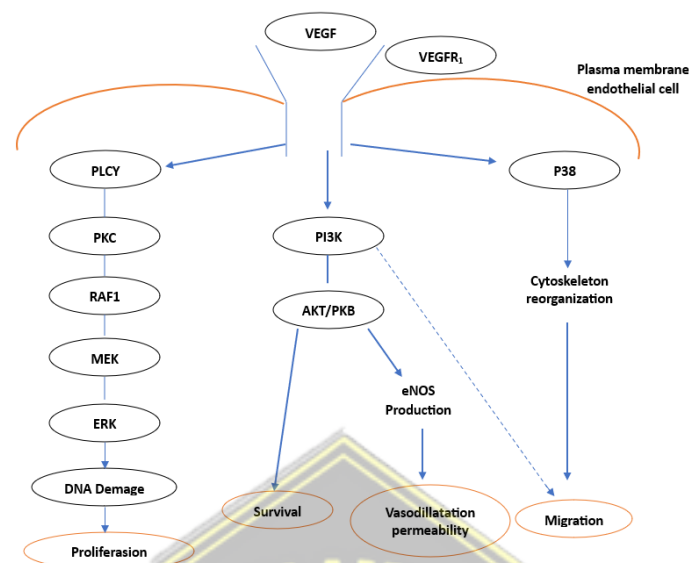
trofoblas dan ditemukan di jaringan plasenta dan rahim. Afinitas VEGF terhadap VEGFR-1 memicu permeabilitas kapiler, migrasi sel, dan proliferasi melalui aktivasi VEGFR-2 oleh VEGF-A.³⁹⁻⁴¹

EG-VEGF atau PK1 membantu pembentukan pembuluh darah baru. EG-VEGF ditemukan di plasenta dan kelenjar yang membuat hormon steroid. Reseptor yang berikatan dengan VEGF memiliki bagian-bagian yang mengaktifkan sinyal di dalam sel ketika VEGF menempel. Ada tiga jenis reseptor VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2, dan VEGFR-3.⁴²

Keluarga VEGF berinteraksi dengan neuropilin, integrin, cadherin, dan heparan sulfat proteoglikan. NP-1 dan NP-2, ko-reseptor non-tirosin kinase, berikatan dengan VEGF spesifik dan mengatur angiogenesis melalui VEGFR-2/3. VEGFR-1 (FLT-1), RTK 180 kDa, memicu angiogenesis patologis (tumor, inflamasi, iskemia, preeklampsia) dan berikatan dengan VEGF-A/B/F, penting untuk diferensiasi dan migrasi sel endotel, monosit, makrofag, dan sel induk hematopoietik.

2.2.2 Peran dan Mekanisme kerja VEGF

VEGF menginduksi migrasi dan kemotaksis sel melalui jalur p38-MAPK/ERK1/2 dan MAPK/ERK. Aktivasi VEGFR-1 pada angiogenesis patologis memicu migrasi sel inflamasi dan pelepasan sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 β).⁴³



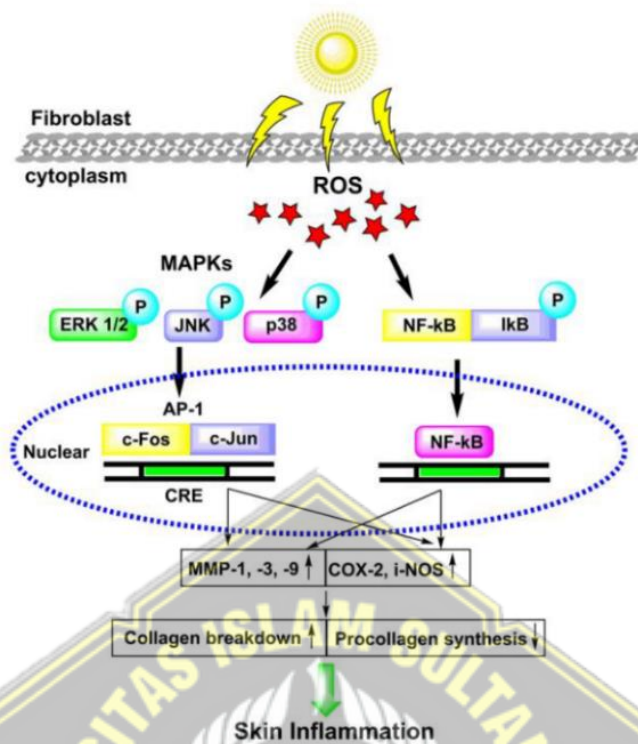
VEGFR-2 (KDR/Flk-1) memiliki afinitas tinggi terhadap VEGF-A dan VEGF-E. Ekspresi VEGFR-2 terbatas pada sel endotel vaskular dan limfatik. Pengikatan VEGF memicu autofosforilasi dan mengaktifkan jalur Ras/Raf/ERK/MAPK dan PLC γ /PKC, yang mendorong proliferasi sel endotel. VEGFR-2 membantu sel-sel pembuluh darah bertahan hidup dan mencegah kematian sel dengan mengaktifkan jalur PI3K/Akt. VEGFR-2 juga membuat sel-sel tersebut berpindah dengan mengaktifkan integrin. VEGFR-3, yang berukuran 195 kDa, lebih suka berikatan dengan VEGF-C dan membantu pembentukan pembuluh limfa pada embrio dan orang dewasa.^{44,45}

Regulasi VEGF dipengaruhi oleh keratinosit, KGF, EGF, TGF- β / α , IL-1 β / α , IL-6, PGE2, IGF-1 (meningkatkan mRNA VEGF) dan TNF- α (meningkatkan ekspresi RNA messenger). Ekspresi gen VEGF bervariasi dengan diferensiasi sel; meningkat pada miogenesis, menurun pada diferensiasi pheochromocytoma.⁴⁶

2.3 Paparan Sinar Ultraviolet B (UV-B)

Sinar ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang 200-400 nm dibagi menjadi UVA, UVB, dan UVC. UVA dan UVB mempengaruhi kulit, dengan UVA dominan tetapi memiliki potensi karsinogenik yang rendah. UVB hanya sedikit dari sinar UV yang mencapai bumi, tetapi sangat aktif secara biologis. UVA jauh lebih banyak dan bisa menembus lebih dalam ke kulit. UVB memiliki energi yang lebih kuat dan 1000 kali lebih mudah menyebabkan kulit merah daripada UVA, serta lebih berbahaya karena menembus lebih dalam ke kulit.

Paparan berulang terhadap UVB mempengaruhi fibroblas yang ada di dermis. Fibroblas terlibat dalam sintesis kolagen dan menempati sebagian besar jaringan ikat. 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.⁴⁷ UVB berdampak membakar kulit, meskipun lebih banyak UVA yang mencapai bumi.⁴⁸ 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 inflamasi lokal pada kulit.⁴⁹



Gambar 2.2 Mekanisme Aktivasi VEGF.⁴⁹

Sinar UVB membuat lebih banyak enzim yang merusak kolagen di kulit. Sinar UVB juga mengaktifkan protein-protein yang menyebabkan peradangan, seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, dan IL- 1β , yang semuanya merusak kulit.⁴⁷ UVB juga mempengaruhi jalur $\text{TGF-}\beta/\text{Smad}$, $\text{TGF-}\beta$ merangsang biosintesis kolagen tipe 1 dan mengatur homeostasis kolagen melalui molekul pemberi sinyal Smad. Sinar UVB menghasilkan zat berbahaya (ROS) yang merusak sinyal sel yang penting untuk pembuatan kolagen. Nrf-2, yang biasanya terikat pada protein lain, terlepas saat terkena UVB dan masuk ke inti sel. Ini memicu pembuatan zat-zat pelindung (HO-1, SOD, GPx, CAT) yang melawan kerusakan akibat zat berbahaya tersebut. Memulihkan berbagai jalur sinyal terkait UV radiasi bisa menjadi strategi yang efektif dalam mencegah photoaging.⁴⁷

Intensitas sengatan matahari ditentukan oleh intensitas dan durasi paparan sinar UV, jenis kulit, dan perlindungan yang digunakan.⁵⁰ Paparan sinar matahari pada lapisan terluar kulit dapat menyebabkan inflamasi atau iritasi. Sinar UV menyebabkan eritema, kerusakan kolagen dan elastin, photoaging, dan kerusakan jaringan kulit akibat stres oksidatif yang merusak lipid, protein, dan DNA.⁵¹

Penelitian pada tahun 2022 menggunakan responden subjek di Indonesia terutama di Jakarta menunjukkan bahwa indeks UV rata-rata adalah 6,22.⁵² Menurut WHO, UVI adalah angka yang menunjukkan seberapa kuat sinar UV yang bisa membuat kulit terbakar di suatu tempat dan waktu tertentu. Angka ini membantu kita tahu seberapa hati-hati kita harus terhadap sinar matahari setiap hari, tergantung di mana kita berada. Karena Indonesia ada di daerah tropis, sinar matahari di siang hari sangat kuat dan berbahaya. Pada orang usia 30-39 tahun, bintik-bintik coklat adalah masalah kulit yang paling sering ditemukan, terutama di pipi karena sinar matahari. Kerutan juga umum terjadi, dan paling jarang di dagu karena kerutan biasanya muncul duluan di sekitar mata dan dahi.⁵²

2.4. Tanaman Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd)

Kelakai merupakan tanaman khas yang tumbuh di Kalimantan. Kelakai digunakan oleh masyarakat untuk mengobati anemia, demam, dan sakit kulit. Kelakai memiliki kandungan bioaktif flavonoid, steroid, dan alkaloid.⁵³ Tumbuh hampir pada semua tempat, bahkan pada tempat yang kurang subur sekalipun. Umumnya tumbuh di lahan gambut yang banyak nutrisi, namun juga dapat tumbuh di tanah yang kurang subur, seperti pasir kuarsa dan tanah aluvial. Tumbuh di daerah beriklim tropis, subtropis, atau Monsal. Tanaman kelakai bisa

ditemukan di banyak negara, seperti Australia, Malaysia, Thailand, Papua Nugini, bahkan di India dan China.⁵⁴

2.4.1. Taksonomi & morfologi tanaman kelakai

Kelakai merupakan tumbuhan genus *Stenochlaena* dengan famili *Blechnaceae* dan Divisi *Pteridophyta*. Taksonomi kelakai sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
 Class : *Filicopsida*
 Order : *Filicales*
 Tribe : *Blechnaceae*
 Genus : *Stenochlaena*
 Species : *Stenochlaena palutris*.

Kelakai merupakan tanaman *pteridophyta* yang tumbuh pada saat hujan musim. Tinggi kurang lebih 50 cm dengan panjang daun berkisar antara 7,5-10,2 cm (Gambar 2.3) Ada dua jenis kelakai, misalnya kelakai merah dan hijau kelakai, perbedaannya warna menunjukkan tingkat kematangan daun. Merah menandakan daunnya masih muda, sedangkan berwarna hijau menunjukkan bahwa daun sudah tua. Kelakai sangat mampu berkembang secara vegetatif. Tingkat pertumbuhan kelakai berbeda di negara-negara musim kemarau dan musim hujan. Tingkat pertumbuhan kelakai lebih lambat di negara-negara musim hujan. Perbedaan dalam kemampuan menghasilkan biomassa serta jumlah air yang terbatas yang dapat dimanfaatkan. Tanaman ini bisa dipanen dalam waktu singkat, sekitar 4 sampai 6 hari, dan bisa dipanen lagi. Tanaman ini juga sangat cocok tumbuh di tempat yang lembap, seperti di tanah gambut.⁵⁴



Gambar 2.3 Daun kelakai

Kelakai dapat dengan mudah diperoleh oleh masyarakat tanpa harus membelinya di pasar. Tanaman ini sering ditemukan di tempat tinggal orang Dayak. Kurangnya inovasi dalam pengolahannya, kelakai masih digunakan secara terbatas dan mendasar, meskipun sangat bergizi. Kegunaannya sebagian besar terbatas pada masakan dan pengobatan tradisional.⁵⁴

2.4.3. Fitofarmaka ekstrak daun kelakai

Simplisia daun kelakai berwarna coklat, tidak berbau, berasa kelat, mengandung sari larut air sebesar 3,34%, sari larut etanol sebesar 1,80%, air sebesar 4,71%, abu total sebesar 6%, abu tidak larut asam sebesar 1%, susut pengeringan sebesar 6%. Ekstrak daun kelakai yang dibuat dengan pelarut berbeda memiliki kepadatan yang berbeda-beda. Hasil tes menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tannin, dan fenolik di daun kelakai, dan senyawa flavonoid serta tannin di ekstrak yang dibuat dengan etil asetat (lihat Tabel 2.1).⁵⁵

Tabel 2. 1 Hasil uji fitokimia ekstrak daun kelakai.⁵⁵

Golongan senyawa	Hasil penapisan			
	Simplisia	Ekstrak N-heksan	Ekstrak etilasetat	Ekstrak Metanol
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	+	-	+	+
Kuinon	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-
Tanin	+	-	+	+
Fenolik	+	-	-	+
Terpenoid	-	-	-	-
Steroid	-	-	-	-
Monoterpen dan Seskuitperpen	-	-	-	-

Simplisia daun kelakai mengandung flavonoid, polifenol, dan tannin, tanpa alkaloid. Ekstrak etil asetat hanya mengandung flavonoid dan tannin, sementara ekstrak metanol mengandung flavonoid, polifenol, dan tannin.⁵⁵

Tabel 2.1 menunjukkan aktifitas antioksidan dari senyawa-senyawa aktif dalam daun kelakai. Infusa kelakai sangat ampuh menangkal radikal bebas, dengan nilai IC₅₀ 6,4035 ppm. Karena nilainya di bawah 50 ppm, infusa kelakai termasuk antioksidan yang sangat kuat.⁵⁶

Tabel 2.2 Kandungan antioksidan pada kelakai.

Ekstrak Kalakai	Pelarut	Fenol (mg GAE/g)	Flavonoid (mg QCE/g)	Aktivitas Antioksidan	
				Uji DPPH	Uji FRAP
Daun	Etanol	3,80 ± 0,22	2,15 ± 0,005	24,24 ± 0,174 µg/ml (IC ₅₀)	17,95 ± 0,026 mM Fe ²⁺ /g
	Etil Asetat	2,65 ± 0,11	3,96 ± 0,072	159,1 ± 0,116 µg/ml (IC ₅₀)	7,54 ± 0,056 mM Fe ²⁺ /g
	Heksana	1,59 ± 0,04	3,20 ± 0,332	323,43 ± 0,450 µg/ml (IC ₅₀)	2,94 ± 0,356 mM Fe ²⁺ /g
	Etanol	2,30 ± 0,09	1,85 ± 0,030	89,96 ± 0,527 µg/ml (IC ₅₀)	3,82 ± 0,184 mM Fe ²⁺ /g
Batang	Etil Asetat	2,30 ± 0,09	1,85 ± 0,030	89,96 ± 0,527 µg/ml (IC ₅₀)	6,79 ± 0,140 mM Fe ²⁺ /g
	Heksana	1,89 ± 0,3	2,75 ± 0,061	323,50 ± 0,095 µg/ml (IC ₅₀)	2,93 ± 0,114 mM Fe ²⁺ /g
	Etanol	-	-	19,06 (IC ₅₀) ppm	-
Akar kalakai di tanah gambut	Etanol	-	-	24,40 (IC ₅₀) ppm	-
Akar kalakai di tanah pasir	Aseton	-	-	56,981 µg/mL	-
Akar	Etil Asetat	9,62	-	1,43 µg/ml (IC ₅₀)	-
	Etanol	4,67	1,99	14,13 (IC ₅₀) ppm	-
Daun	Heksana	1,87	3,23	13,3 µg/ml (IC ₅₀)	180,58 µg/ml (EC ₅₀)
	Heksana	19,7 ± 0,8	12,4 ± 0,6	464,70 ± 20,75 (EC ₅₀)	155 ± 2 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Kloroform	43,4 ± 2,4	1,7 ± 0,6	218,65 ± 9,57 (EC ₅₀)	318 ± 6 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Etil asetat	133,0 ± 2,0	35,2 ± 1,3	49,68 ± 3,44 (EC ₅₀)	1248 ± 12 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Metanol	503,4 ± 22,8	6,9 ± 0,1	11,65 ± 0,46 (EC ₅₀)	8366 ± 346 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Air	319,5 ± 7,5	13,7 ± 0,1	19,30 ± 0,21 (EC ₅₀)	4583 ± 79 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Kloroform fraksi	95,6 ± 0,9	-	134,80 ± 3,70 (EC ₅₀)	297 ± 3 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Etil asetat fraksi	415,2 ± 7,2	85,7 ± 5,4	15,03 ± 0,25 (EC ₅₀)	7692 ± 19 mM Fe ²⁺ /g
Daun	N-butanol fraksi	457,0 ± 9,5	58,3 ± 0,9	13,16 ± 0,22 (EC ₅₀)	5919 ± 525 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Air fraksi	623,7 ± 5,1	7,5 ± 0,2	7,71 ± 0,11 (EC ₅₀)	9749 ± 83 mM Fe ²⁺ /g
Daun	Maserasi	14,5 ± 0,7	-	-	-
Asam askorbat	-	-	-	28,8 ± 0,011	-
Asam askorbat	-	-	-	-	25,236 ± 128 mM Fe ²⁺ /g

2.4.2. Kandungan dan manfaat tanaman kelakai

Kelakai dianggap bergizi dan bermanfaat bagi kesehatan manusia, terdapat beberapa mikronutrien dan antioksidan menjadi efek menguntungkan untuk digunakan dalam pengobatan tradisional. Kelakai mengandung kaya akan sumber fitokimia, mengandung komponen bioaktif flavonoid, fenolik, terpenoid, dan alkaloid.⁸ Kelakai mendapat perhatian yang meningkat dalam bidang pengobatan herbal karena aplikasi farmakologisnya yang luas, termasuk pengobatan eksim dan penyembuhan luka, sebagai anti inflamasi, agen antimikroba dan antioksidan, dan dalam pengobatan diabetes. Kelakai memiliki daun yang dapat dimakan sepanjang tahun (pinnae lebar, bergerigi). Daun subur (pinnae tipis, spora) musiman dan tidak dapat dimakan. Pelepah muda (hijau muda, merah, lembut) berbeda dari pelepah dewasa. Daun kelakai muda steril digunakan dalam pengobatan tradisional untuk penyakit kulit, diare, demam, dan tukak lambung.⁸ Menurut hasil penelitian, kelakai punya banyak mineral yang bagus untuk tubuh, terutama kalium dan fosfor, sehingga tanaman ini punya nilai gizi yang tinggi⁸

Kelakai memiliki kandungan air yang tinggi, sama seperti beberapa sayuran berdaun umum. Tepung kelakai cenderung memiliki nilai gizi yang lebih tinggi karena kandungan airnya telah dihilangkan. Kandungan serat pada kelakai terbilang paling tinggi jika dibandingkan dengan sayuran berdaun biasa seperti kangkung, daun singkong dan sawi. Kelakai batangnya memiliki serat yang lebih sedikit dibandingkan daun kelakai, ekspresi vitamin C kelakai 8-47 mg per 100 gram, lebih tinggi dibandingkan wortel.⁵⁴

Tanaman kelakai ditanam secara alami dan bebas dari pupuk sintetis dan pestisida, dan ramuan alami yang tersedia ini merupakan sumber antioksidan makanan yang baik.^{8,54} Kelakai memiliki beberapa zat bioaktif yang berperan sebagai antioksidan yang kuat dalam ekstraknya karena terdapat flavonoid, fenol, saponin, terpenoid.⁵⁷⁻⁶⁰ Kelakai memiliki sifat antioksidan dan antikanker, yang dapat membantu mencegah penyakit akibat radikal bebas. Kandungan fenolik dan flavonoid dalam kelakai, yang bertanggung jawab atas sifat-sifatnya, dapat diukur kuantitasnya bersama dengan aktivitas antioksidannya menggunakan uji DPPH. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa kelakai dapat mempertahankan kesegarannya hingga dua hari setelah panen sebelum layu. Mengurangi kelembaban, mempertahankan suhu daun yang rendah, dan menutupi ujung potongan pakis dengan kapas basah sebelum dipanen meningkatkan proses degeneratif penuaan.⁵⁸

Kelakai dapat menangkal radikal bebas dan antioksidan aktivitas sangat tergantung pada konten dan jenis flavonoid yang dikandungnya. Flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan yang memiliki dampak positif terhadap nutrisi dan kesehatan manusia.⁶¹ Senyawa flavonoid dan fenolik adalah metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan melakukan berbagai aktivitas biologis. Fenolik, antioksidan alami yang sangat efektif, mencegah penyakit kardiovaskular, penuaan, dan radikal bebas. Konsumsi buah dan sayuran kaya fenolik sangat disarankan. Para ilmuwan telah melihat fitokimia dalam berbagai produk alami, termasuk buah-buahan dan sayuran yang dapat dimakan.⁸

2.4.3. Formulasi serum ekstrak daun kelakai

Serum untuk perawatan pada kulit merupakan salah satu sediaan semisolid dalam industri farmasi¹⁰ Serum diformulasikan untuk menghasilkan bahan-bahan yang ditargetkan dan ampuh untuk mengatasi masalah perawatan kulit tertentu. Serum dirancang untuk menembus kulit secara mendalam dan memberikan nutrisi, hidrasi, atau mengatasi masalah seperti kerutan atau pigmentasi. Serum berfungsi melembabkan kulit secara keseluruhan.⁶²

Molekul kecil serum menyerap pada kulit lebih dalam, meningkatkan efektivitas dalam perawatan kulit seperti pigmentasi dan tanda-tanda penuaan. Serum wajah adalah produk perawatan kulit ampuh yang dirancang dengan konsentrasi bahan aktif yang lebih tinggi, menjadikannya efektif sebagai kosmetik. Serum tidak mengandung bahan tambahan dan pengisi, sehinggaperawatan masalah kulit dapat secara langsung dan efisien. Serum lebih cepat meresap ke kulit, bisa masuk lebih dalam, dan biasanya lebih banyak kandungan bahan aktifnya daripada krim. Tekstur serum juga lebih cair.⁶²

Penelitian melaporkan ekstrak daun kelakai mempengaruhi aktivitas superoksida dismutase, ekspresi anion superoksida, ekspresi karbonil, dan diena terkonjugasi pada kulit tikus yang dipapar sinar UV.¹⁸ Krim akar kelakai dengan konsentrasi ekstrak 1-3% menunjukkan sifat fisik yang serupa selama 14 hari pengujian. Formulasi krim dengan ekstrak 2% (300-350 ppm) memiliki nilai SPF 11-12, menandakan perlindungan matahari maksimal.¹⁹ Kelakai mendapat perhatian dalam bidang pengobatan herbal karena aplikasi untuk pengobatan

eksim dan penyembuhan luka, sebagai anti inflamasi, agen antimikroba dan antioksidan.⁸

2.5. Pengaruh serum ekstrak daun kelakai terhadap ekspresi IL-6 dan VEGF pada kulit mencit yang dipapar sinar UVB subkronis

UV-B meningkatkan ROS, menyebabkan inflamasi, yang merusak pertahanan kulit dan menurunkan kolagen.⁶³ ROS mengaktifasi MAPK dan meningkatkan matriks MMPs.⁶⁴ Aktivasi MAPK akibat paparan UV-B memicu sel inflamasi pada kulit sehingga meningkatkan ekspresi IL-6. Peningkatan ekspresi IL6 mengkatifasi MMPs dan enzim lain yang dapat merusak kulit.⁶⁵ ROS juga menyebabkan peningkatan NF-kB dan AP1, serta menurunkan ekspresi VEGF, sehingga terjadi kerusakan kolagen yang menyebabkan *photoaging*.^{64 66}

Kelalai berperan dalam mencegah *photoaging* melalui aktifitas antioksidan, yaitu menghambat pembentukan ROS sehingga menghambat kerusakan oksidatif pada kulit.^{67 69} Tubuh tidak dapat menghasilkan cukup antioksidan untuk melawan radikal bebas, sehingga perlu mendapatkannya dari sumber eksternal. Antioksidan bekerja dengan menetralkan radikal bebas melalui donasi elektron, sehingga memutus rantai reaksi yang dapat merusak sel.⁶⁸ Mekanisme antioksidan dapat secara langsung maupun tidak langsung, menyumbangkan ion hidrogen untuk menetralsir efek toksik radikal bebas.⁶⁸

Serum antioksidan mengurangi zat berbahaya (ROS) dengan menghambat enzim dan radikal bebas. Flavonoid, salah satu jenis antioksidan, menghambat enzim-enzim yang menghasilkan ROS. Flavonoid dapat menstabilkan radikal

bebas yang terlibat dalam proses oksidatif dengan mengkomplekskannya dengan radikal bebas. Flavonoid bekerja melawan zat berbahaya (ROS) dalam tubuh dengan cara memberikan elektron. Kemampuan ini ditingkatkan oleh struktur khususnya, dan flavonoid mampu menetralkan berbagai jenis ROS seperti radikal hidroksil, peroksil, dan peroksinitrit. Hal ini terjadi melalui donasi atom hidrogen serta elektron dari gugus hidroksil flavonoid, reaksi yang kemudian menghasilkan radikal flavonoid yang relatif stabil. Flavonoid menunjukkan potensial reduksi yang lebih rendah, berkisar antara 0,23 hingga 0,75 V, dibandingkan dengan radikal bebas yang memiliki potensial reduksi antara 1,0 hingga 2,3 V.⁷⁰

Radikal pengoksidasi yang kuat akan diubah menjadi radikal flavonoid (o-semiquinone). Radikal flavonoid ini kemudian bisa melakukan tiga hal: bergabung dengan radikal pengoksidasi lain, memberikan atom hidrogen dan membentuk kuinon, atau bergabung dengan radikal flavonoid lainnya.⁷⁰

Serum kulit diformulasikan untuk menghasilkan bahan-bahan yang ditargetkan dan ampuh untuk mengatasi masalah perawatan kulit, molekul kecil serum memfasilitasi penetrasi kulit lebih dalam, meningkatkan efektivitasnya dalam menargetkan masalah perawatan kulit.⁶² Serum dari ekstrak daun kelakai diharapkan lebih encer supaya lebih cepat meresap ke dalam kulit. Dengan begitu, kulit bisa mendapat lebih banyak nutrisi dan kelembapan, kerutan dan flek hitam juga bisa berkurang. Serum ini juga diharapkan bisa mempengaruhi kadar IL-6 dan VEGF di kulit.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Kulit kena sinar UVB, bisa meradang dan jadi susah melindungi diri. Kolagen juga berkurang, kulit jadi cepat tua.⁶³ Makrofag, sel dendritik, dan neutrofil punya semacam radar bernama PRR yang bisa mendeteksi komponen mikroba (PAMPs) dan sinyal bahaya dari sel rusak (DAMPs). Kalau 'radar' ini mendeteksi PAMPs atau DAMPs, sel-sel imun ini akan diaktifkan dan memproduksi zat-zat yang bikin peradangan.⁷¹

Saat kulit stres karena sering terpapar sinar UVB, asam retinoat (RA) sangat dibutuhkan. RA membantu kulit mengatasi peradangan, memperbaiki kerusakan pembuluh darah, dan mempercepat regenerasi jaringan. RA mempengaruhi ekspresi VEGF dan IL-6 dengan menekan ekspresi VEGF dengan berikatan pada reseptor RAR/RXR, yang menghambat aktivasi faktor transkripsi HIF-1 α , serta menurunkan aktivitas jalur PI3K/AKT/mTOR, sehingga mengurangi proliferasi sel endotel dan angiogenesis berlebih akibat stres oksidatif UVB. Selain itu, RA menurunkan ekspresi IL-6 dengan menghambat aktivasi NF- κ B, meningkatkan kapasitas antioksidan melalui jalur Nrf2, serta memodulasi TGF- β untuk menekan respons inflamasi.

Faktor pertumbuhan seperti VEGF membuat fibroblas jadi aktif. Fibroblas jadi lebih banyak dan menghasilkan banyak matriks ekstraseluler, yang penting untuk jaringan tubuh.⁷² Tubuh kita punya cara untuk mengatasi peradangan dan memperbaiki kerusakan, salah satunya dengan bantuan IL-6.

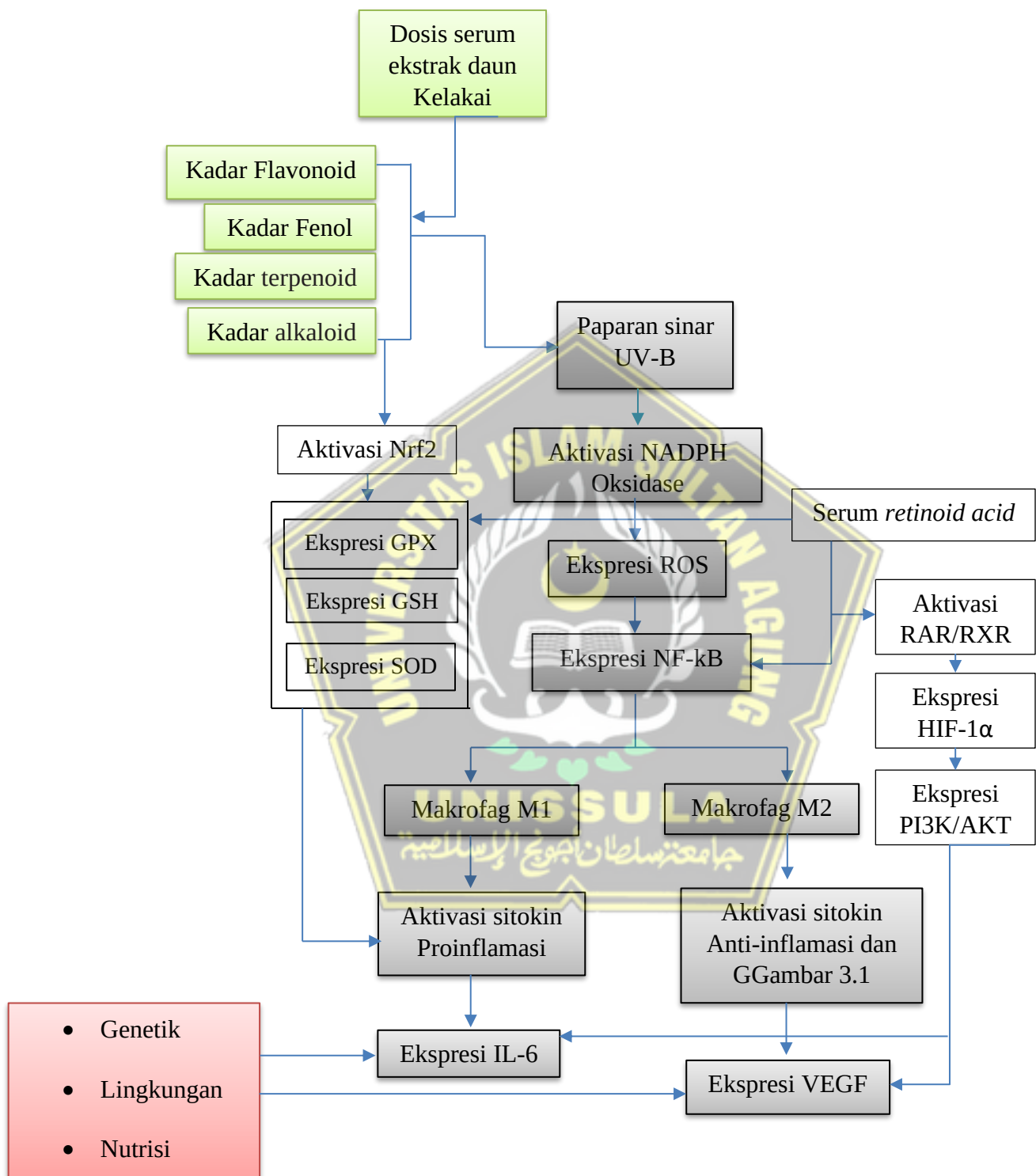
Tapi, radikal bebas (ROS) bisa bikin masalah jadi lebih buruk. ROS meningkatkan NF-kB dan AP1, serta menurunkan VEGF, yang akhirnya merusak kolagen dan membuat kulit cepat tua (photoaging).^{64 66} Penurunan aktivitas antioksidan menyebabkan peningkatan ROS, yang selanjutnya menghambat diferensiasi myofibroblast.⁷⁴ Kelakai adalah contoh tumbuhan alami yang memiliki sifat antioksidan. Daun kelakai mengandung fenolik dan flavonoid yang telah terbukti sangat efektif sebagai antioksidan.⁶⁹ Mekanisme antioksidan menyumbangkan ion hidrogen untuk menetralkan efek toksik radikal bebas.⁶⁹

Sediaan serum dengan kandungan antioksidan menekan pembentukan ROS menekan produksi radikal bebas. Flavonoid bisa mencegah pembentukan ROS dengan cara memblokir kerja enzim-enzim yang membuatnya, seperti xantin oksidase, protein kinase C, dan banyak lagi enzim lainnya. Selain membersihkan, flavonoid dapat menstabilkan radikal bebas yang terlibat dalam proses oksidatif dengan mengkomplekskannya dengan radikal bebas. Flavonoid melindungi sel dari kerusakan oksidatif dengan mendonorkan atom hidrogen dan elektron ke ROS, mengubahnya menjadi molekul yang lebih tidak berbahaya. Struktur khusus flavonoid memfasilitasi proses ini dan menghasilkan radikal flavonoid yang stabil.⁷⁰

Radikal flavonoid (*o-semiquinone*) yang terbentuk memiliki tiga kemungkinan nasib: bereaksi dengan radikal pengoksidasi, memberikan atom hidrogen membentuk kuinon, atau bergabung dengan radikal flavonoid lainnya.⁷⁰

Serum kulit diformulasikan untuk menghasilkan bahan-bahan yang ditargetkan dan ampuh untuk mengatasi masalah perawatan kulit, molekul kecil serum memfasilitasi penetrasi kulit lebih dalam, meningkatkan efektivitasnya dalam menargetkan masalah perawatan kulit.⁶² Serum ekstrak daun kelakai yang cair akan lebih mudah diserap oleh kulit, sehingga diharapkan lebih efektif dalam memberikan manfaat perawatan kulit dan mempengaruhi ekspresi IL-6 dan VEGF.

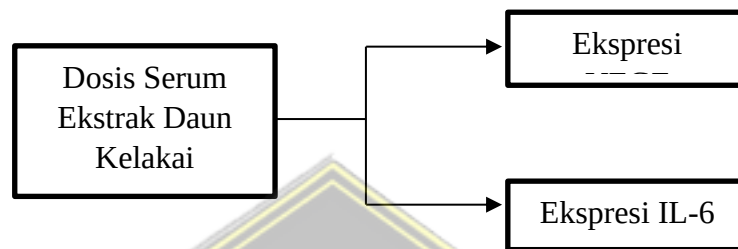




Gambar 3.2 Kerangka Teori.

3.2. Kerangka Konsep

Berdasarkan variabel bebas yaitu dosis serum daun kelakai dan variabel terikat yaitu ekspresi VEGF dan IL-6.



Gambar 3.3 Kerangka Teori.

3.3. Hipotesis

Serum dari daun kelakai ternyata berpengaruh pada jumlah VEGF dan IL-6 di kulit mencit yang kena sinar UVB.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium untuk melihat apakah krim dari ekstrak daun kelakai bisa mempengaruhi jumlah VEGF dan IL-6 pada kulit mencit BALB/c yang disinari UVB selama 14 hari.

4.2. Populasi dan sampel

4.2.1. Populasi

Subyek pada penelitian menggunakan mencit BALB/c, total subjek berjumlah 25 ekor, berusia 3 bulan dengan bobot tubuh 25-30g yang memenuhi syarat hewan penelitian sesuai kriteria dan layak digunakan untuk digunakan sebagai subyek penelitian. Terdapat kriteria yang harus terpenuhi sebagai objek penelitian: kriteria *inklusi* dan *eksklusi*.

a. Kriteria *Inklusi*:

1. Mencit dipapar sinar UVB
2. Kondisi tikus sehat

b. Kriteria *Eksklusi*:

Mencit mati selama masa adaptasi.

c. Kriteria *Drop out*

Mencit mati selama perlakuan.

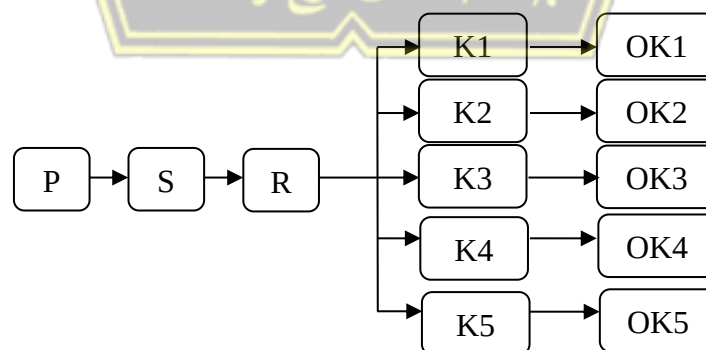
4.2.2. Sampel

Sampel penelitian diambil dari jumlah total dan dibagi secara acak.

Subjek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol sehat (K1) subjek tanpa perlakuan yang diberi pakan standar selama 14 hari,
- Kelompok kontrol negatif (K2) subjek dipapar sinar UVB kemudian diberikan basis serum selama 14 hari,
- Kelompok kontrol positif (K3) subjek dipapar sinar UVB dan kemudian diberikan serum retinoid 0,025% selama 14 hari,
- Kelompok perlakuan (K4) menerima serum ekstrak daun kelakai dengan dosis 2% selama 14 hari setelah dipaparkan sinar UVB,
- Kelompok perlakuan (K5) menerima serum ekstrak daun kelakai dengan dosis 4% selama 14 hari setelah dipaparkan sinar UVB,

Pembagian kelompok penelitian diskemakan seperti pada gambar berikut:



Gambar 4.1 Skema sampel penelitian

Keterangan :

P : Populasi

S : Sampel

R : Randomisasi

OK1 : Observasi/ pengukuran ekspresi VEGF dan IL-6 di K1,

OK2 : Observasi/ pengukuran ekspresi VEGF dan IL-6 di K2,

OK3 : Observasi/ pengukuran ekspresi VEGF dan IL-6 di K3,

OK4 : Observasi/ pengukuran ekspresi VEGF dan IL-6 di K4,

OK5 : Observasi/ pengukuran ekspresi VEGF dan IL-6 di K5.

Total jumlah subjek yang diperlukan dalam penelitian ditentukan menggunakan rumus eksperimen sebagai berikut:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 5 \geq 15$$

$$n \geq (15+4)/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq \approx 5$$

Keterangan: t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan.

Penelitian ini membutuhkan minimal 25 ekor mencit, dengan 5 ekor dialokasikan untuk setiap kelompok. Selain itu, 5 ekor mencit cadangan juga disiapkan untuk mencegah kekurangan sampel.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

a. Variabel Bebas

Serum ekstrak daun kelakai dosis 2% dan 4%

b. Variabel Prakondisi

Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB subkronis selama 14 hari.

c. Variabel Terikat

Ekspresi VEGF dan ekspresi IL-6

4.3.2. Definisi Operasional

a. Serum ekstrak daun kelakai

Ekstrak daun kelakai dibuat secara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan pelarut diuapkan dari campuran gunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kelakai dibuat sediaan serum konsentrasi 2% dan 4%, basis serum ekstrak kelakai (*propilen glikol*, *trietanolamin*, dan *natrium benzoate*).⁷⁵ Sediaan serum dioleskan secara topikal sekali setiap hari pada bagian punggung selama 14 hari, setiap kali dioleskan 15 menit setelah paparan UVB.⁷⁶

Hasil ukur : mg

Skala pengukuran : Ordinal.

b. Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF pada jaringan kulit mencit BALB/c diukur setelah perlakuan topikal selama 14 hari. Jaringan diwarnai dengan imunohistokimia (IHC) menggunakan antibodi VEGF, diamati dengan mikroskop pada 10 lapang pandang dan 6 kali pengulangan, lalu dianalisis oleh ahli patologi anatomi.⁷⁷

Satuan hasil : Persentase (%)

Skala pengukuran : Rasio.

c. Ekspresi IL-6

Ekspresi IL-6 pada jaringan kulit sampel mencit BALB/c setelah perlakuan selama 14 hari. Untuk melihat seberapa banyak IL-6 di kulit yang terkena UVB, digunakan metode imunohistokimia dengan antibodi IL-6.

Kulit diamati di bawah mikroskop sebanyak 10 kali di tempat yang berbeda, dan setiap tempat diamati 6 kali. Hasilnya kemudian dianalisis oleh dokter spesialis patologi anatomi.⁷⁷

Satuan hasil : Persentase (%)

Skala pengukuran : Rasio.

4.4. Peralat dan bahan

4.4.1. Alat

Proses pembuatan ekstrak, perlakuan pada tikus wistar, dan pemeriksaan sampel memerlukan peralatan yang berbeda-beda. Alat-alat yang digunakan meliputi rotary evaporator, soxhlet, oven, alat fiksasi, lampu UV, pisau scalpel, PBS, dan centrifuge.

4.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun kelakai segar, bahan-bahan untuk membuat serum (propilen glikol, trietanolamin, dan natrium benzoat), alkohol 70%, kasa, kapas, mencit BALB/c, makanan mencit, dan air suling. Bahan kimia untuk membuat buffer, larutan formalin, larutan xylazine dan ketamine.

4.5. Alur penelitian dan tahap pengerjaan

4.5.1. Pengajuan izin etik (*Ethical clearence*)

Ethical clearence penelitian diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

4.5.2. Penentuan Dosis

Ekstrak daun kelakai terbukti bisa melawan bakteri penyebab jerawat (*Propionibacterium acnes*) pada dosis 5%, 10%, dan 15%. Dosis 5% adalah yang paling ampuh, dengan daya hambat paling kuat (27,82 mm) dan nilai KBM serta KHM terbaik.²⁰ Krim ekstrak daun kelakai, khususnya formulasi II dengan ekstrak 2%, menunjukkan perlindungan matahari maksimal dengan nilai SPF 11 dan 12 pada konsentrasi 300 ppm dan 350 ppm.²⁰ Penelitian ini akan menggunakan serum dari ekstrak daun kelakai dengan kadar 2% dan 4% untuk dioleskan ke kulit mencit BALB/c yang sudah disinari UVB.

4.5.3. Pembuatan Ekstrak daun kelakai

Ekstraksi daun kelakai dilakukan dengan maserasi 500g serbuk dalam 3750 ml etanol 70% selama 5 hari. Ampas hasil penyaringan dimaserasi ulang 3 kali dengan 1250 ml etanol 70%. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator.⁷⁸

4.5.4. Penentuan ekspresi Flavonoid dan fenol dari ekstrak daun kelakai

Uji Ekspresi Flavonoid Total

➤ Pembuatan Larutan Baku

Kuersetin dilarutkan dalam metanol (1000 ppm) dan dibuat seri konsentrasi 9-24 ppm. Reagen ditambahkan, diinkubasi, dan absorbansi diukur pada 433,5 nm. Persamaan regresi linier digunakan untuk menentukan koefisien korelasi (r).

➤ Penetapan Ekspresi Flavonoid

Total Fraksi etil asetat diukur dalam konsentrasi 500 ppm. Selanjutnya diambil 2 ml dari larutan tersebut lalu ditambahkan 0,1 ml alumunium triklorida, 0,1 ml na-asetat 1 M, dan 2,8 ml aqua pro injeksi. Metode analisis flavonoid ini melibatkan inkubasi, pengukuran serapan pada 433,5 nm, dan perhitungan kadar flavonoid total menggunakan rumus. Kuersetin digunakan sebagai standar, dan replikasi dilakukan tiga kali.

b. Uji Ekspresi Fenol Total

➤ Pembuatan Larutan Baku

Analisis asam galat dilakukan dengan membuat larutan stok 100 ppm, diikuti pengenceran menjadi 15-55 ppm. Setelah penambahan reagen dan inkubasi pada 50°C selama 5 menit, absorbansi diukur pada 757,5 nm. Koefisien korelasi (r) ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi dan absorbansi.

➤ Penetapan Ekspresi Fenol Total

1 ml fraksi etil asetat 100 ppm ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan natrium karbonat 10% dalam labu ukur 10 ml selanjutnya ditambah aqua pro injeksi hingga tanda batas dan digojog homogen. Metode analisis fenol total ini melibatkan pemanasan larutan pada 50°C selama 5 menit, inkubasi selama 10 menit, dan pengukuran absorbansi pada 757,5 nm. Asam galat digunakan sebagai standar, dan pengujian diulang 3 kali.

4.5.5. Pembuatan Sediaan Serum Ekstrak Daun Kelakai

Serum ekstrak daun kelakai dibuat menggunakan xanthan gum, air, propilenglikol, ekstrak daun kelakai, dan trietanolamin. Xanthan gum dilarutkan dalam air panas untuk membentuk mucilago, yang kemudian dicampur dengan bahan-bahan lain. Volume akhir serum adalah 20 ml.⁷⁵

4.5.6. Pengambilan sampel jaringan kulit mencit terpapar UVB

Setelah 14 hari perlakuan dengan krim ekstrak daun kelakai, pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke-15. Jaringan kulit yang terpapar UVB dipotong dari mencit yang telah diterminasi, kemudian ditimbang dan ditambahkan dengan PBS (pH 7,4). Sampel jaringan di homogenisasi dalam kondisi dingin suhu 4°C, selanjutnya setrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 rpm, selama 20 menit. Sampel uji adalah supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi.

4.5.7. Pemeriksaan ekspresi VEGF dan IL-6 menggunakan Metode IHC

1. Bagian parafin (ketebalan 5 μm) dipanaskan hingga 60°C dan dideparafinasi dengan cara direndam dalam tiga pertukaran xilena (masing-masing 30 menit).
2. Bagian-bagian tersebut kemudian direhidrasi melalui serangkaian alkohol bertingkat pencucian (etanol 100%, 95%, 70%, 50%, dan 30%, deionisasi air, dan air deionisasi lagi; 20 menit untuk setiap pertukaran).
3. Bagian jaringan yang dideparafinasi dicerna dengan hialuronidase (1 mg/mL dalam 0,1 M natrium asetat dan 150 m M natrium

klorida, pH 5,5) selama 30 menit pada suhu 37°C untuk mengekspos epitop antigenik.

4. Setelah mencuci bagian tiga kali selama 10 menit masing-masing dalam buffer fosfatsaline (PBS), bagian diinkubasi selama 30 menit dalam metanol yang mengandung 0,3% hidrogen peroksida untuk memadamkan aktivitas peroksidase endogen.
5. Cuci bagian tersebut tiga kali masing-masing 10 menit dalam PBS, kemudian inkubasi dengan 1,5%
6. Setelah dicuci kembali, potongan selanjutnya diinkubasi dengan poliklonal primer antibodi A 1/30 (10 µg/mL) selama 4 jam pada suhu kamar.
7. Bagian tersebut dibilas, selanjutnya diinkubasi dengan antibodi terbiotinilasi (2 µg/mL) selama 30 menit pada suhu kamar.
8. Selanjutnya, bagian tersebut dicuci tiga kali dan diolah dengan konjugasi *peroksidase streptavidin* (2 µg/mL, Dako) selama 30 menit pada suhu kamar.
9. Setelah tiga kali pencucian selama 10 menit dalam PBS, antibodi yang terikat ditunjukkan dengan menggunakan Substrat 3-amino-9-etilkarbazol (substrat AEC, Dako) dengan adanya 3% hidrogen peroksida selama 15 menit.
10. Setelah pengembangan substrat, bagian-bagian tersebut dibilas dan diwarnai Kembali

11. Direndam selama 1 menit dalam pewarnaan hematoxilin Smith (Sigma).
12. Sampel diberi kode, diperiksa ekspertis patologi anatomi dan diberi skor secara semikuantitatif.⁷⁷

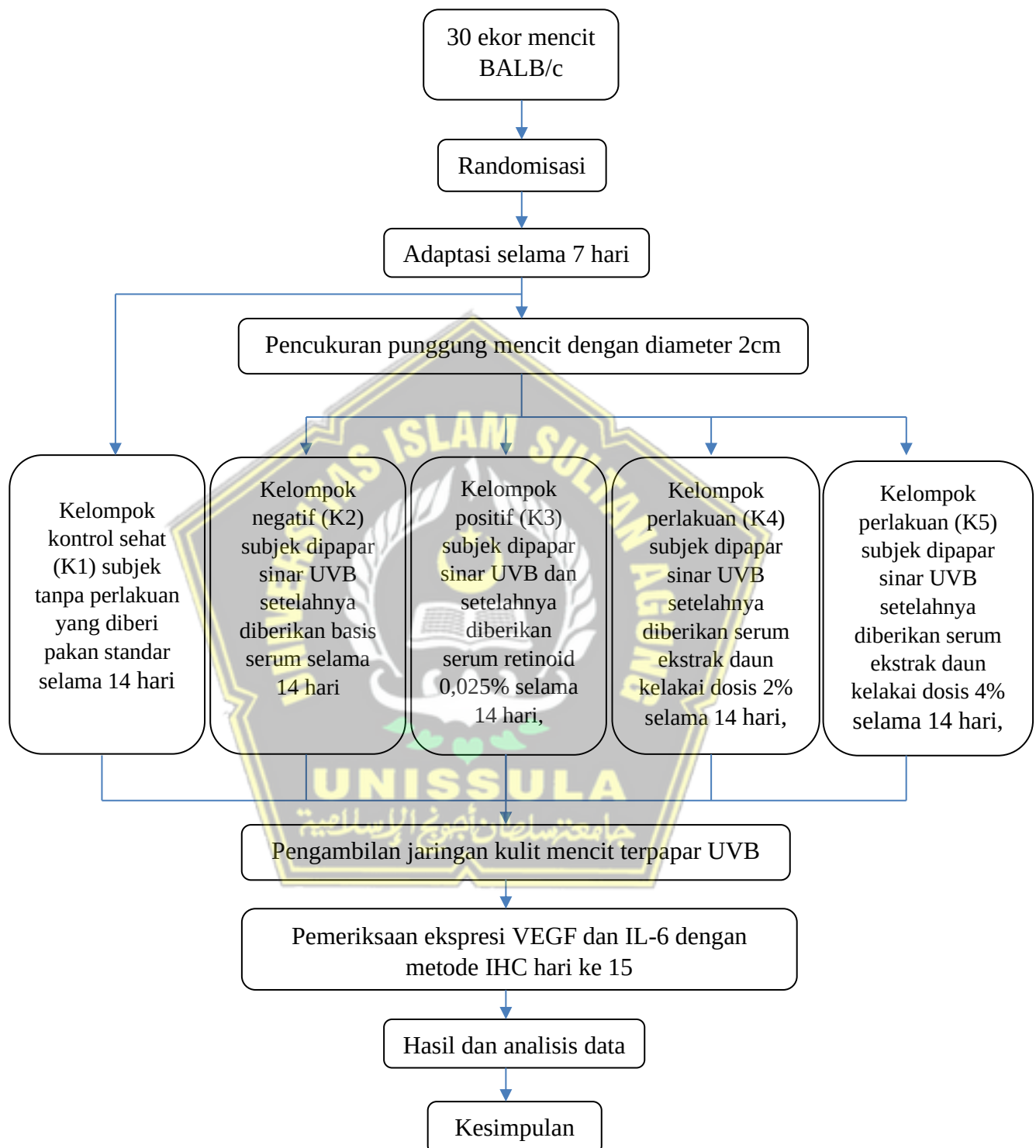
4.6. Analisa Data

Data dianalisis dengan deskriptif statistik, terus diuji normalitasnya pakai *Shapiro-Wilk*, dan homogenitasnya pakai *Levene*. Hasil penelitian pada ekspresi VEGF dan IL-6 didapatkan data terdistribusi tidak normal, maka dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* ($P < 0,05$) untuk melihat perbedaan terhadap semua kelompok dan dilanjutkan dengan uji beda antar dua kelompok dengan uji *Mann Whitney* ($P < 0,05$). SPSS digunakan untuk menganalisis data dan membuat keputusan tentang hipotesis berdasarkan tingkat kepercayaan 95% (α 5%).

4.7. Jadwal Pelaksanaanya Penelitian

Penelitian ini dilakukan di lab IBL Fakultas Kedokteran pada bulan Oktober-November 2024.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan metode imunohistokimia (IHC) untuk menganalisis ekspresi VEGF dan IL-6 pada jaringan kulit mencit. Penelitian ini melibatkan 30 ekor mencit BALB/c yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang berbeda, termasuk kelompok kontrol dan kelompok yang diberi serum ekstrak daun kelakai. Penelitian ini dilakukan di IBL Fakultas Kedokteran UNISSULA pada bulan Oktober-November 2024.

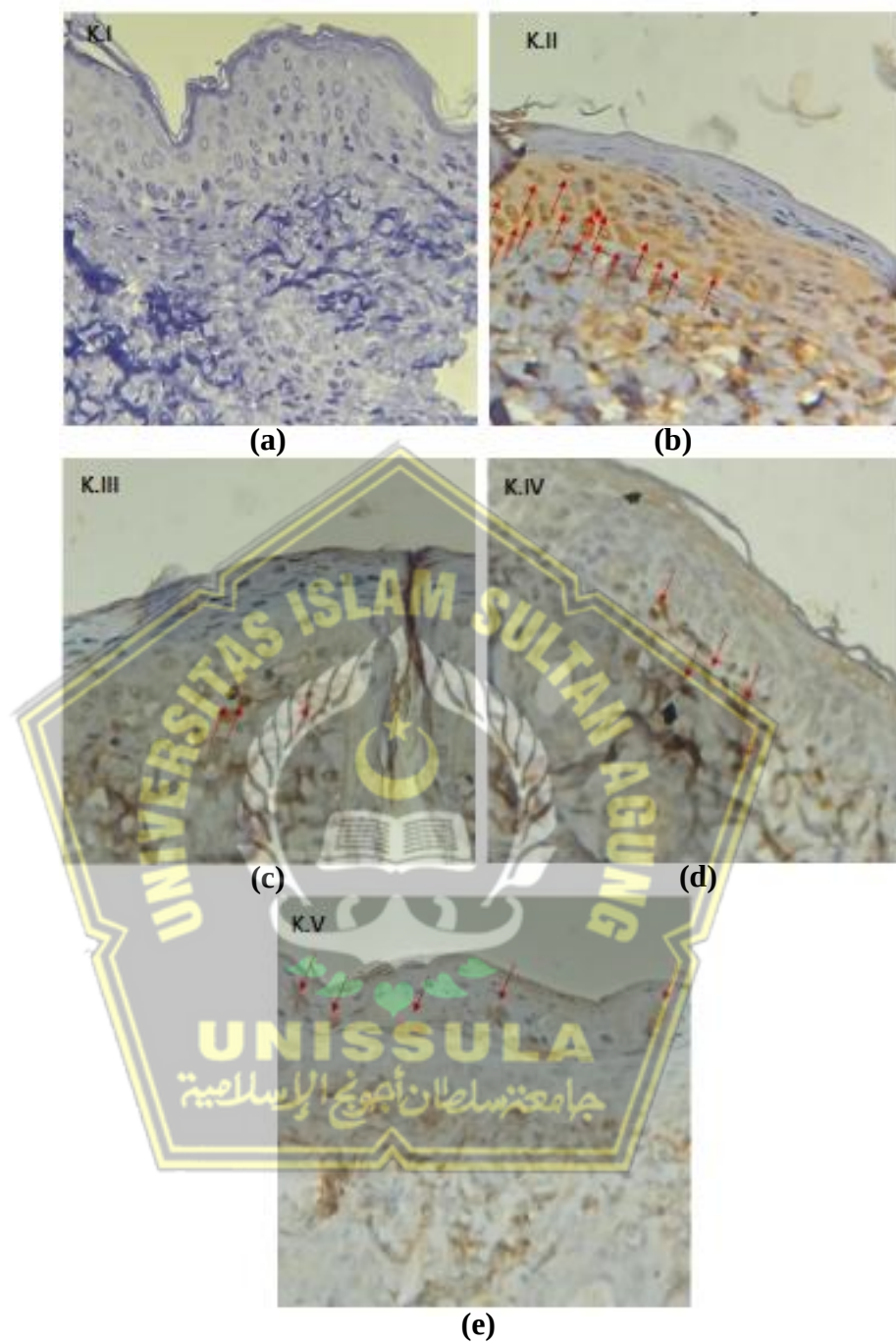
5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil analisis ekspresi VEGF dan IL-6 jaringan kulit pada setiap kelompok dengan metode imunohistokimia (IHC).

Imunohistokimia (IHC) adalah metode untuk mendeteksi ekspresi protein spesifik, seperti VEGF dan IL-6, dalam jaringan menggunakan antibodi target. Prinsip kerjanya berdasarkan interaksi spesifik antara antibodi dan antigen, yang kemudian divisualisasikan melalui reaksi warna berbasis enzim atau fluoresensi. Prosesnya mencakup ikatan antigen-antibodi, deteksi dengan antibodi sekunder berkonjugasi enzim (HRP atau AP), serta amplifikasi sinyal untuk meningkatkan sensitivitas. Teknik ini memungkinkan analisis ekspresi protein secara in situ, dimana deteksi dan visualisasi protein langsung pada jaringan atau sel utuh, tanpa perlu mengekstraksi protein dari sampel. Teknik ini memungkinkan analisis distribusi spasial dan tingkat ekspresi protein dalam struktur seluler atau jaringan yang tetap terjaga.

Reaksi kromogenik untuk visualisasi, di mana enzim yang terkonjugasi pada antibodi sekunder akan mengkatalisis reaksi dengan substrat kromogenik, yang menghasilkan endapan warna coklat pada lokasi ekspresi VEGF atau IL-6. Intensitas warna ini dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk menentukan tingkat ekspresi protein dalam jaringan. Untuk meningkatkan kontras dan memperjelas struktur jaringan, dilakukan pewarnaan kontras dengan hematoksilin, yang memberikan warna biru pada inti sel, sehingga distribusi ekspresi VEGF dan IL-6 dapat diamati dengan lebih jelas. Preparat kemudian dikeringkan dan ditutup dengan mounting medium, sehingga siap untuk diamati di bawah mikroskop. Metode ini memungkinkan identifikasi ekspresi protein dalam jaringan secara spasial dan kuantitatif, sehingga sangat berguna dalam studi angiogenesis, inflamasi, dan berbagai kondisi patologis lainnya.

Hasil analisis ekspresi VEGF dan IL-6 jaringan kulit pada tiap kelompok dengan pewarnaan IHC seperti pada Gambar 5.1.:



Gambar 5.1 Ekspresi VEGF pada berbagai kelompok perlakuan: (a) K1, (b) K2, (c) K3, (d) K4, (e) K5. Tanda panah menunjukkan sitoplasma yang terwarnai gelap menandakan ekspresi VEGF

VEGF, faktor pertumbuhan utama, penting untuk angiogenesis dan regenerasi jaringan. Pada jaringan kulit yang mengalami kerusakan akibat paparan UVB, ekspresi VEGF dapat meningkat sebagai respons terhadap stres oksidatif dan inflamasi untuk memperbaiki jaringan yang rusak.

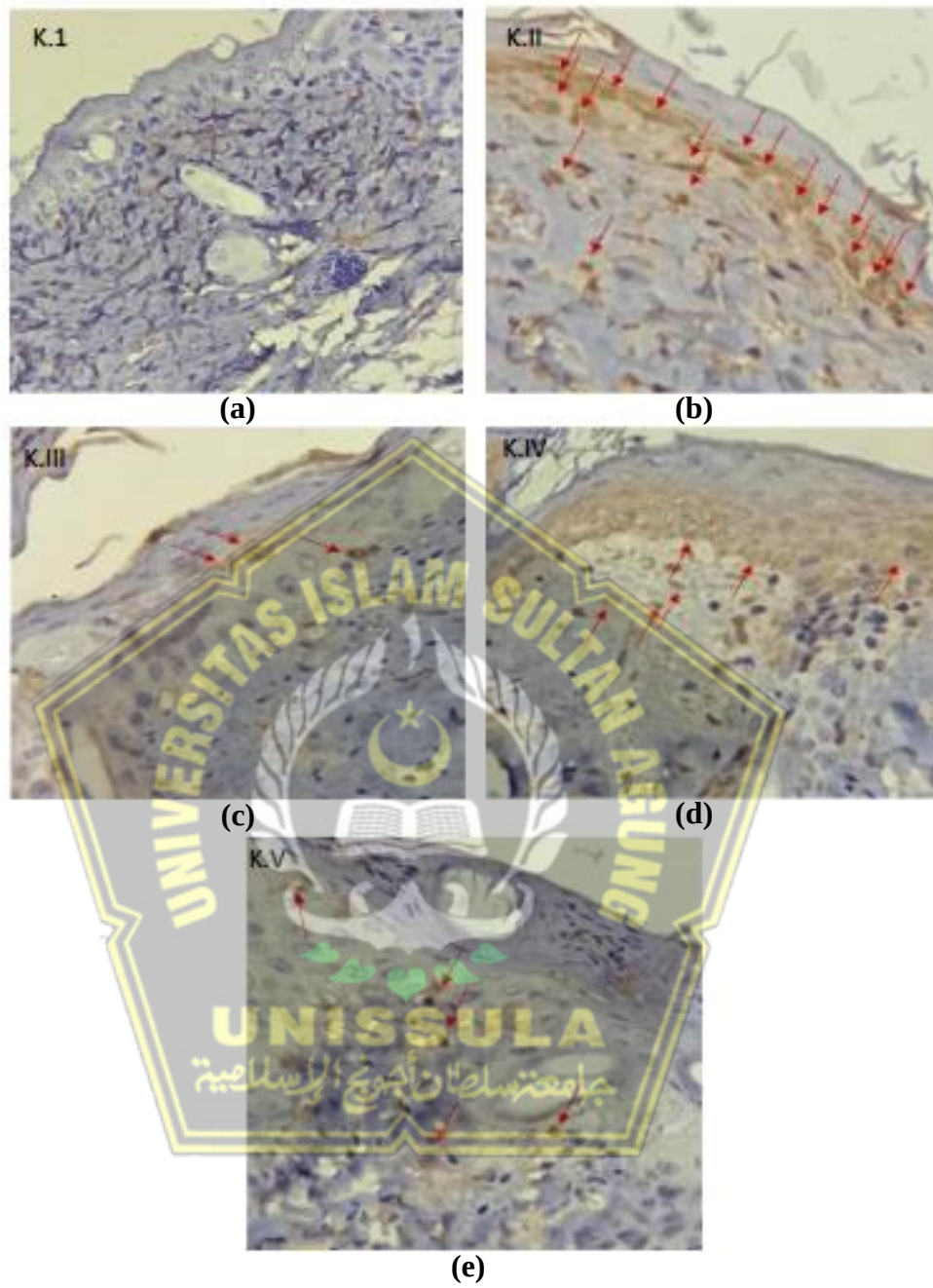
Paparan sinar UVB dapat memicu stres oksidatif yang berdampak pada peningkatan ekspresi VEGF sebagai respons terhadap kerusakan jaringan. Dalam kelompok Kontrol Sehat (K1), ekspresi VEGF tetap rendah atau dalam kondisi basal, mencerminkan keseimbangan homeostasis tanpa adanya stres lingkungan. Sebaliknya, kelompok kontrol negatif (K2), yang terpapar UVB tanpa intervensi terapeutik, menunjukkan ekspresi VEGF yang tinggi akibat peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Jalur HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha*) teraktivasi, merangsang VEGF untuk memperbaiki jaringan yang mengalami hipoksia, tetapi tanpa kontrol yang tepat, kondisi ini dapat menyebabkan neovaskularisasi abnormal dan inflamasi berkepanjangan.

Sebagai perbandingan, kelompok kontrol positif (K3), yang diberikan serum retinoid 0,025% setelah paparan UVB, mengalami penurunan ekspresi VEGF dibandingkan K2. Retinoid dikenal memiliki efek antiinflamasi dan merangsang regenerasi kulit, sehingga dapat mengurangi stres oksidatif serta menormalkan ekspresi VEGF dengan mempercepat regenerasi epidermis. Lebih lanjut, kelompok perlakuan dengan serum ekstrak daun kelakai menunjukkan hasil yang menjanjikan. Pada kelompok K4 (2%), ekspresi

VEGF lebih rendah dibandingkan K2, tetapi masih lebih tinggi dibandingkan K3. Kandungan flavonoid dan fenolik dalam ekstrak daun kelakai bertindak sebagai antioksidan yang mampu mengurangi stres oksidatif, meskipun dosis ini mungkin belum cukup optimal dalam menekan inflamasi dan modifikasi VEGF secara signifikan.

Sementara itu, kelompok K5 (4%) menunjukkan penurunan ekspresi VEGF yang lebih baik dibandingkan K4, bahkan mendekati tingkat yang diamati pada K3. Gambar 5.1 menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak meningkatkan kandungan antioksidan dan senyawa bioaktif, memberikan efek antiinflamasi dan regeneratif yang lebih optimal. Dengan regulasi VEGF yang lebih terkontrol, pemulihan jaringan menjadi lebih efektif dengan risiko inflamasi yang lebih rendah. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kelakai dosis 4% berpotensi sebagai alternatif alami dalam mempercepat pemulihan kulit akibat paparan UVB, mendekati efektivitas serum retinoid.

Hasil pewarnaan IHC terhadap ekspresi IL-6 (Gambar 5.2.) menunjukkan bahwa paparan UVB meningkatkan inflamasi, yang terlihat dari ekspresi IL-6 yang tinggi pada kelompok K2. Retinoid (K3) dan ekstrak daun kelakai (K4 & K5) berperan dalam menurunkan ekspresi IL-6, dengan efektivitas tertinggi pada dosis 4% (K5). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kelakai dosis 4% dapat menjadi alternatif alami yang menjanjikan dalam mengurangi inflamasi akibat paparan UVB, dengan efektivitas yang mendekati serum retinoid.



Gambar 5.2 Ekspresi IL-6 pada berbagai kelompok perlakuan: (a) K1, (b) K2, (c) K3, (d) K4, (e) K5. Tanda panah menunjukkan sitoplasma yang terwarnai gelap menandakan ekspresi IL-6

5.1.2 Hasil rerata ekspresi VEGF dan IL-6 pada setiap kelompok

Hasil uji dan analisis rerata ekspresi VEGF pada masing-masing kelompok penelitian ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil analisis rerata ekspresi VEGF dan IL-6 jaringan kulit

Variabel	Kelompok					p
	K1 Rerata ±SD	K2 Rerata ±SD	K3 Rerata±SD	K4 Rerata±SD	K5 Rerata±SD	
Ekspresi VEGF	0,08 ± 0,11	18,88 ± 0,27	2,68 ± 0,11	5,12 ± 0,23	4,40 ± 0,24	
<i>Saphiro wilk</i>	0,006	0,000	0,006	0,814	0,146	
<i>Levene's Test</i>						0,569
<i>Kruskal Wallis</i>						0,000
Ekspresi IL-6	0,08 ± 0,11	17,92 ± 0,18	2,68 ± 0,11	4,92 ± 0,23	4,44 ± 0,26	
<i>Saphiro wilk</i>	0,006	0,000	0,006	0,814	0,421	
<i>Levene's Test</i>						0,222
<i>Kruskal Wallis</i>						0,000

Keterangan:

- *Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)
- *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)
- *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

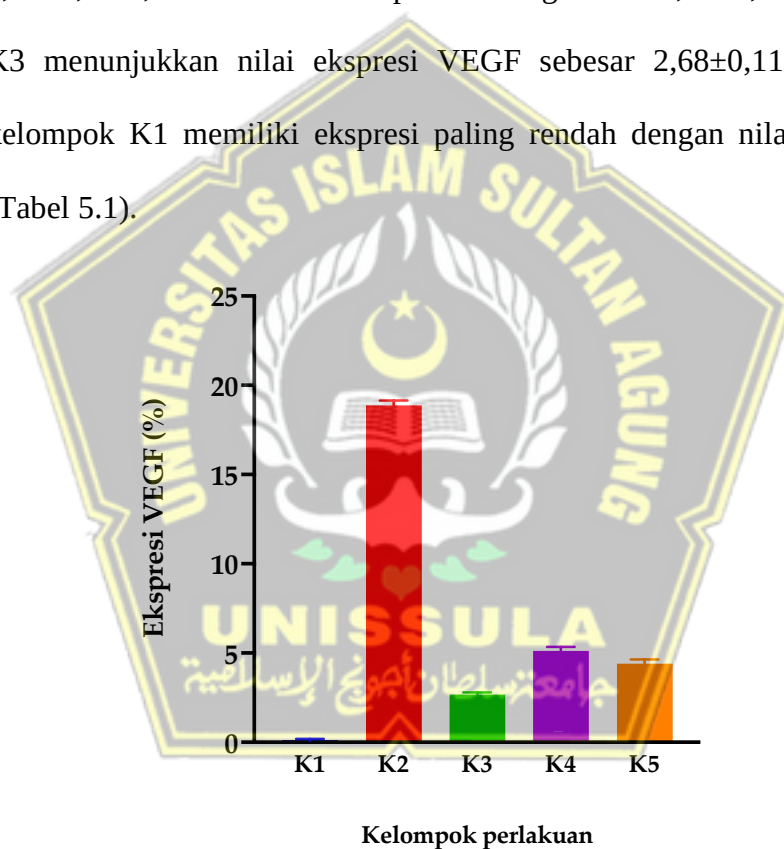
Untuk menganalisis data ekspresi VEGF yang tidak terdistribusi normal (uji *Shapiro-Wilk*, $p < 0,05$) namun homogen (uji *Levene*, $p = 0,569$), digunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasilnya menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p = 0,000$). Hasil statistik uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar dua kelompok perlakuan.

Untuk menganalisis data ekspresi IL-6 yang tidak terdistribusi normal (uji *Shapiro-Wilk*, $p < 0,05$) namun homogen (uji *Levene*, $p = 0,222$), digunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasilnya menunjukkan perbedaan

signifikan antar kelompok perlakuan ($p=0,000$). Uji *Mann-Whitney* kemudian dilakukan untuk membandingkan perbedaan antar dua kelompok.

5.1.3 Ekspresi VEGF jaringan kulit pada setiap kelompok

Hasilnya, kelompok K2 punya ekspresi VEGF paling tinggi dengan nilai $18,88 \pm 0,27\%$. Kelompok K4 memiliki nilai lebih rendah, yaitu $5,12 \pm 0,23\%$, diikuti oleh kelompok K5 dengan nilai $4,40 \pm 0,24\%$. Kelompok K3 menunjukkan nilai ekspresi VEGF sebesar $2,68 \pm 0,11\%$, sementara kelompok K1 memiliki ekspresi paling rendah dengan nilai $0,08 \pm 0,11\%$ (Tabel 5.1).



Gambar 5.3 Ekspresi VEGF pada tiap kelompok perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi VEGF lebih rendah pada kelompok perlakuan serum retinoid $0,025\%$, pada serum ekstrak daun kelakai 2% dan 4% didapatkan nilai lebih tinggi dibanding kelompok serum retinoid $0,025\%$, tapi tidak lebih bawah dari kelompok sehat. Seperti terlampir pada tabel 5.2:

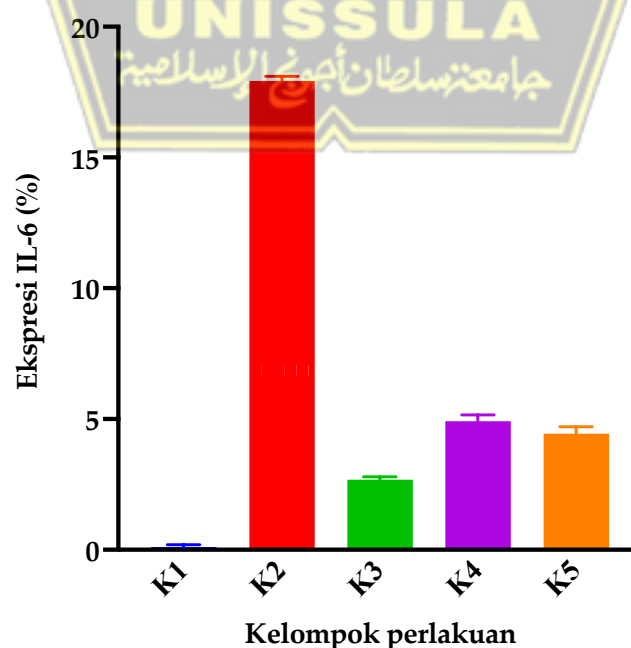
Tabel 5.2 Uji *Mann-Whitney* ekspresi VEGF pada tiap kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,006*	0,007*	0,008*	0,008*
K2	0,006*		0,006*	0,007*	0,007*
K3	0,007*	0,006*		0,008*	0,008*
K4	0,008*	0,008*	0,008*		0,008*
K5	0,008*	0,007*	0,008*	0,008*	

Keterangan: berbeda signifikan ($p < 0,05$)

5.1.4 Ekspresi IL-6 jaringan kulit pada setiap kelompok

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi IL-6 paling tinggi terdapat pada kelompok K2 dengan nilai $17,92 \pm 0,18\%$. Kelompok K4 memiliki nilai lebih rendah, yaitu $4,92 \pm 0,23\%$, diikuti oleh kelompok K5 dengan nilai $4,44 \pm 0,26\%$. Kelompok K3 menunjukkan ekspresi sebesar $2,68 \pm 0,11\%$, sementara kelompok K1 memiliki ekspresi paling rendah dengan nilai $0,08 \pm 0,11\%$ (Tabel 5.1).



Gambar 5.4 Ekspresi IL-6 pada tiap kelompok perlakuan

Tabel 5.3 Uji *Mann-Whitney* ekspresi IL-6 pada masing-masing kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,006*	0,007*	0,008*	0,008*
K2	0,006*		0,002*	0,007*	0,007*
K3	0,007*	0,002*		0,008*	0,008*
K4	0,008*	0,007*	0,008*		0,026*
K5	0,008*	0,007*	0,008*	0,026*	

Keterangan: berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Hasil penelitian terhadap ekspresi IL-6 lebih rendah pada kelompok perlakuan serum retinoid 0,025%, pada serum ekstrak daun kelakai 2% dan 4% didapatkan nilai lebih tinggi dibanding kelompok serum retinoid 0,025%, namun tidak lebih rendah dari kelompok sehat. Perlakuan serum ekstrak daun kelakai 4% memberikan pengaruh lebih rendah terhadap ekspresi IL-6 dibanding serum ekstrak daun kelakai 2%.

5.2 PEMBAHASAN

Sinar UVB bisa bikin kulit memproduksi lebih banyak VEGF. Soalnya, UVB bikin stres oksidatif dan meningkatkan ROS. Nah, ROS ini mengaktifkan protein kinase, yang kemudian mendorong produksi IL-6 dan VEGF.⁸⁰ Kelompok kontrol sehat menunjukkan ekspresi VEGF yang paling rendah karena tidak terpapar UVB, sehingga tidak terjadi peningkatan ROS dan stres oksidatif yang dapat memicu ekspresi VEGF. Secara keseluruhan, mekanisme ini menjelaskan mengapa paparan UVB meningkatkan ekspresi VEGF, dan bagaimana intervensi dengan ekstrak daun

kelakai dan retinoid dapat menurunkan ekspresi VEGF melalui aktivitas antioksidan dan antiinflamasi.^{54,81}

Kelompok dengan perlakuan retinoid lebih efektif dalam menekan ekspresi VEGF dibandingkan serum ekstrak daun kelakai, karena memiliki efek antiproliferatif yang lebih kuat dalam menghambat angiogenesis berlebihan. Sebaliknya, ekstrak daun kelakai memiliki efek antiinflamasi yang moderat, namun tetap mempertahankan respon angiogenik yang diperlukan untuk mendukung regenerasi jaringan, sehingga ekspresi VEGF pada kelompok ini masih lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat. Retinoid menekan inflamasi dan VEGF secara signifikan, Sementara itu, ekstrak daun kelakai dapat menjadi alternatif terapi untuk mempercepat regenerasi jaringan, dengan tetap mengontrol inflamasi, tetapi tidak menekan VEGF secara berlebihan agar proses penyembuhan tetap optimal.^{82,83} Efek penurunan ekspresi IL-6 paling baik ditunjukkan oleh serum retinoid 0,025%, diikuti ekstrak daun kelakai dosis 4%, dan kemudian dosis 2%. Pada dosis 4%, lebih banyak flavonoid tersedia untuk menekan aktivasi NF- κ B, sehingga produksi IL-6 lebih terkendali dibandingkan dosis 2%. Penurunan IL-6 yang menurun membantu mengurangi inflamasi tanpa menghambat proses penyembuhan, berbeda dengan retinoid yang dapat menekan inflamasi secara lebih agresif, berisiko menyebabkan iritasi atau memperlambat pemulihan jaringan jika digunakan berlebihan.²²

Ekstrak daun kelakai mempercepat regenerasi jaringan tanpa menekan inflamasi berlebihan berkat kandungan flavonoid, saponin, dan fenol. Flavonoid bertindak sebagai antioksidan kuat yang mengurangi stres oksidatif serta memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat produksi IL-6, mencegah inflamasi

berlebihan. Saponin dan fenol juga berperan dalam mengurangi inflamasi dan mendukung penyembuhan luka, sehingga ekstrak ini efektif dalam mempercepat regenerasi jaringan.⁸⁴ Ekstrak daun kelakai mempercepat regenerasi jaringan dengan meningkatkan angiogenesis dan proliferasi fibroblas. Flavonoid dalam ekstrak ini merangsang produksi VEGF, yang mendukung pembentukan pembuluh darah baru untuk memasok nutrisi dan oksigen ke area yang rusak. Saponin membantu proliferasi fibroblas, yang berperan dalam sintesis kolagen dan pemulihan struktur jaringan. Mekanisme ini memungkinkan penyembuhan luka lebih cepat dengan tetap menjaga respons inflamasi pada tingkat optimal.⁸⁵ Dengan mekanisme tersebut, ekstrak daun kelakai mampu mempercepat proses regenerasi jaringan dengan cara mengendalikan inflamasi pada tingkat yang optimal, tanpa menekannya secara berlebihan. Hal ini memastikan bahwa respon inflamasi yang diperlukan untuk penyembuhan tetap berlangsung, namun tidak berlanjut ke tahap yang merusak jaringan.⁵⁶

Kandungan flavonoid yang tinggi dan aktivitas antioksidan yang kuat pada infusa daun kelakai berperan penting dalam penyembuhan luka.⁸⁵ Ekstrak etanol daun kelakai mengandung flavonoid dalam jumlah tinggi, yang berkontribusi pada sifat antioksidan dan anti-inflamasinya, sehingga membantu regenerasi jaringan.²⁰ Dengan demikian, ekstrak daun kelakai menawarkan pendekatan alami yang efektif dalam mempercepat regenerasi jaringan melalui mekanisme pengendalian inflamasi dan stimulasi proses penyembuhan, tanpa menekan respon inflamasi yang diperlukan untuk pemulihan.¹⁸ Penelitian lainnya melaporkan uji dosis-respons untuk menentukan dosis optimal ekstrak daun kelakai, sehingga efek antiinflamasi

dan regenerasi kulit tetap seimbang tanpa menekan VEGF secara berlebihan. Dengan metode ini, ekstrak daun kelakai dapat dibandingkan dengan retinoid untuk menilai efektivitas dan keamanannya, serta mengembangkan formulasi terapi yang lebih baik. Dari hasil pengamatan, jika ekstrak daun kelakai dosis $>4\%$ mampu menekan IL-6 dan meningkatkan VEGF tanpa menyebabkan iritasi, maka dapat menjadi alternatif alami retinoid, terutama bagi individu dengan kulit sensitif. Namun, jika retinoid lebih efektif dalam menekan inflamasi tetapi memiliki efek samping tinggi, maka kombinasi retinoid dosis rendah + ekstrak daun kelakai dosis optimal menjadi strategi terbaik untuk memaksimalkan regenerasi kulit sambil meminimalkan efek samping iritasi.

Penelitian ini masih memiliki beberapa keterbatasan, untuk meningkatkan validitas temuan, diperlukan penelitian lanjutan yang melibatkan model hewan atau uji klinis agar data yang diperoleh lebih relevan dengan aplikasi terapeutik pada manusia. Selain itu, variasi konsentrasi yang lebih luas perlu diuji guna menentukan dosis optimal yang memberikan manfaat antiinflamasi maksimal. Penggunaan teknik analisis yang lebih canggih, seperti RT-PCR, Western blot, atau ELISA, juga disarankan untuk meningkatkan ketepatan dalam mengukur biomarker inflamasi lainnya. Studi jangka panjang juga diperlukan untuk memastikan apakah efek antiinflamasi yang diamati bersifat sementara atau memiliki dampak yang berkelanjutan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Serum ekstrak daun kelakai ternyata berpengaruh pada kadar VEGF dan IL-6 di mencit BALB/c yang kena sinar UVB subkronis.
- b. Serum ekstrak daun kelakai 2% memengaruhi ekspresi VEGF pada mencit yang dipapar UVB, berbeda dengan kelompok control.
- c. Serum ekstrak daun kelakai 4% memengaruhi ekspresi IL-6 pada mencit yang dipapar UVB, berbeda dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

- a. Uji klinis pada manusia dan penelitian lanjutan pada hewan diperlukan untuk menguji efektivitas dan keamanan ekstrak daun kelakai dalam aplikasi dermatologi
- b. Mekanisme molekuler yang terlibat dalam efek antioksidan dan anti-inflamasi ekstrak daun kelakai perlu diidentifikasi melalui penelitian lebih lanjut
- c. Melakukan penelitian -menggunakan dosis ekstrak daun kelakai dosis >4% untuk mengamati ekspresi IL-6 dan VEGF serta efek yang ditimbulkan

DAFTAR PUSTAKA

1. Kumar R, Deep G, Agarwal R. An Overview of Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Cancer Chemoprevention by Silibinin. *Curr Pharmacol Rep.* 2015;1(3):206-215. doi:10.1007/s40495-015-0027-9
2. Hensler S, Mueller MM. *Inflammation and Skin Cancer Old Pals Telling New Stories.*; 2013. www.journalppo.com
3. Li C, Fu Y, Dai H, Wang Q, Gao R, Zhang Y. Recent progress in preventive effect of collagen peptides on photoaging skin and action mechanism. *Food Science and Human Wellness.* 2022;11(2):218-229. doi:10.1016/j.fshw.2021.11.003
4. Zasada M, Budzisz E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatol Alergol.* 2019;36(4):392-397. doi:10.5114/ada.2019.87443
5. 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
6. Ahmed IA, Mikail MA, Zamakshshari N, Abdullah ASH. Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology.* 2020;21(3):293-310. doi:10.1007/s10522-020-09865-z
7. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936
8. Ndanusa AH, Cicuzza D, Monowarul M, Siddique M. *Analysis of the Phytochemical Contents and Anti-Oxidative Properties of Stenochlaena Palustris.*; 2020. <http://www.ifrj.upm.edu.my>
9. Hendra R, Khodijah R, Almurdani M, et al. Free Radical Scavenging, Anti-Infectious, and Toxicity Activities from *Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd. Extracts. *Adv Pharmacol Pharm Sci.* 2022;2022. doi:10.1155/2022/5729217
10. Paramawidhita RY, Citrariana S, Sumasfida D. Effectiveness of Sun Protection Factor In Vitro Preparation of Kelakai Root Ethanol Extract (*Stenochlaena palustris* Bedd) Origin Central Kalimantan. *Jurnal Surya Medika (JSM).*8(3):268-75. Published online 2022.
11. Forestryana D, Putri AN, Liani NA. Pengembangan Formula Masker Gel Peel Off Ekstrak Etanol 70% Akar Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burn. F) Bedd.). *Farmasains : Jurnal Ilmiah Ilmu Kefarmasian.* 2020;7(1):1-5. doi:10.22236/farmasains.v7i1.4423

12. Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H. *Potensi Ekstrak Kelakai (Stenochlaena Palustris (Burm. f) Bedd) Terhadap Kadar Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF- α) Pada Mencit BALB/c Yang Diinfeksi Plasmodium Berghei ANKA.*; 2016.
13. Mashuri M, Sihombing LDM, Alfaqihah S, Edyson E, Suhartono E. Kelakai Extract Protects Skin from UV-Induced Oxidative Damage. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Vol 1374. Institute of Physics Publishing; 2019. doi:10.1088/1742-6596/1374/1/012014
14. Sumarawati T, Chodidjah, Fatmawati D. Effect of Combination of Soybean and Phaleria macrocarpa Ethanol Extract on IL6, TNF α , VEGF and Fibroblasts in Mice Exposed to UVB. *Pharmacognosy Journal*. 2023;15(1):6-13. doi:10.5530/pj.2023.15.2
15. D SA, Fadli MA. Formulation and Characterization of Cosmetic Serum Containing Argan Oil as Moisturizing Agent. doi:10.5220/0009846300010001
16. Arshad M, Sadeef Y, Shakoor MB, et al. Quantitative estimation of the hydroquinone, mercury and total plate count in skin-lightening creams. *Sustainability (Switzerland)*. 2021;13(16). doi:10.3390/su13168786
17. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936
18. Mashuri M, Sihombing LDM, Alfaqihah S, Edyson E, Suhartono E. Kelakai Extract Protects Skin from UV-Induced Oxidative Damage. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Vol 1374. Institute of Physics Publishing; 2019. doi:10.1088/1742-6596/1374/1/012014
19. Paramawidhita RY, Adawiyah R, Umaternate A. The Formulation and Physical Evaluation of Emulgel the Kalakai (Stenochlaena Palustris Bedd) Roots Ethanol Extract As a Sunscreen. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Vol 1764. IOP Publishing Ltd; 2021. doi:10.1088/1742-6596/1764/1/012021
20. Pramadiyani N, Darsono PV, Audina M. Aktivitas Antibakteri dan Formulasi Serum Ekstrak Etanol Daun Kelakai (Stenochlaena Palustris (Burm.F) Bedd.) Terhadap Bakteri Propionibacterium Acnes. *Jurnal Inovasi Kesehatan Adaptif*. 2023;5(5):80-96.
21. Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(1):61-67. doi:10.1007/s12079-015-0302-x

22. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
23. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(7):399-409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
24. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines.* 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
25. Nishimoto N, Yoshizaki K, Tagoh H, et al. *Elevation of Serum Interleukin 6 Prior to Acute Phase Proteins on the Inflammation by Surgical Operation.* Vol 50.; 1989.
26. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:367-388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603
27. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
28. Heinrich PC, Castell J V, Andust T. *And the Acute Phase Response.* Vol 265.; 1990.
29. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med.* 2021;53(7):1116-1123. doi:10.1038/s12276-021-00649-0
30. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (United Kingdom).* 2014;53(7):1321-1331. doi:10.1093/rheumatology/keu035
31. Shen TNY, Kanazawa S, Kado M, et al. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PLoS One.* 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0178232
32. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines.* 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
33. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines.* 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101

34. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
35. Stanca Melincovici C, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2). <http://www.rjme.ro/>
36. Wiszniak S, Schwarz Q. Exploring the intracrine functions of vegf-a. *Biomolecules.* 2021;11(1):1-13. doi:10.3390/biom11010128
37. Parikh U, Masri L, Saravanan S, Li H, Miao Q, Balaji S. Role of cytokines and chemokines in wound healing. In: *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes.* Elsevier; 2020:197-235. doi:10.1016/B978-0-12-816413-6.00011-3
38. Haigh JJ. Role of VEGF in organogenesis. *Organogenesis.* 2008;4(4):247-256. doi:10.4161/org.4.4.7415
39. Nur Rosyid F, Dharmana E, Suwondo A, Seno KHNH. VEGF: structure, biological activities, regulations and roles in the healing of diabetic ulcers. *Int J Res Med Sci.* 2018;6(7):2184. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20182801
40. Castillo MFR, Cohen A, Edberg D, et al. Vascular endothelial growth factor in bipolar depression: A potential biomarker for diagnosis and treatment outcome prediction. *Psychiatry Res.* 2020;284. doi:10.1016/j.psychres.2020.112781
41. Wang Y, Zang QS, Liu Z, et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301:695-704. doi:10.1152/ajpcell.00322.2010.-Endothelial
42. Wautier JL, Wautier MP. Vascular Permeability in Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7). doi:10.3390/ijms23073645
43. Ghahramani M, Razavi Majd Z. The Effect of Physical Activity on VEGF and HIF-1 Signaling. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences.* 2020;9(2). doi:10.5812/jcrps.98493
44. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, et al. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets and metabolism. *Curr Biol.* 2003;13:1070-1074. doi:10.1016/S.
45. Ribatti D. The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system. *Mech Dev.* 2019;160. doi:10.1016/j.mod.2019.103579
46. Dalton SJ, Whiting CV, Bailey JR, Mitchell DC, Tarlton JF. Mechanisms of chronic skin ulceration linking lactate, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, collagen remodeling, collagen stability, and defective

- angiogenesis. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):958-968. doi:10.1038/sj.jid.5700651.
47. 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
 48. 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
 49. 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
 50. 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
 51. Nobile V, Zanoletti V, Manzoni V, Romagnoli S, Cestone E. Soothing Effect of a Cosmetic Product on Skin Discomforts Induced by a Chemical Irritant (Capsaicin) and UV-Radiation, and after Mosquito Bites and Sunburn in a Real-World Setting. *Cosmetics.* 2022;9(6). doi:10.3390/cosmetics9060130
 52. Respati RA, Yusharyahya SN, Wibawa LP, Widaty S. The Dermoscopic Features of Photoaging and Its Association with Sun Index Score in the Coastal Population at Cilincing, Jakarta: A Cross-Sectional Study. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022;Volume 15:939-946. doi:10.2147/CCID.S355260
 53. Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H. Potensi ekstrak kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) terhadap kadar tumor necrosis factor-alfa (TNF- α) pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA.
 54. Pandiangan FI, Oslo EA, Destine F, Josephine J, Anwar RN. A Review on the Health Benefits of Kalakai (*Stenochlaena Palustris*). *Journal of Functional Food and Nutraceutical.* 2022;4(1):1-16. doi:10.33555/jffn.v4i1.98
 55. Khoirunnisa R, Susanti R, Purwanti NU. Penetapan Kadar Total Flavonoid dan Fenol Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Rimpang Acorus SP. *Jurnal Untan.* 2019;4(1):1-4.
 56. Hakim AR, Savitri AS, Saputri R. Aktivitas Antioksidan Dari Infusa Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd). *Journal Pharmaceutical Care and Sciences.* 2021;1(2):121-125. doi:10.33859/jpcs.v2i1.69

57. Adawiyah R, Sartika F, Arfianto F. Potensi Ekstrak Akar Kalakai (*Stenochlaena palustris* Bedd) Sebagai Antihiperlipidemia Yang Diuji Secara In Vivo. *Jurnal Pharmascience*. 2020;7(1):62. doi:10.20527/jps.v7i1.8075
58. Gunawan-Puteri MDPT, Kato E, Rahmawati D, et al. Post-harvest and Extraction Conditions for the Optimum Alpha Glucosidase Inhibitory Activity of *Stenochlaena palustris*. *International Journal of Technology*. 2021;12(3):649-660. doi:10.14716/ijtech.v12i3.4409
59. Arullappan S, Sawai S, Chee LA, Mahandan M, Shanmugavelan R. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *stenochlaena palustri* (Burm.f.) bedd. leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2017;51(4):S735-S740. doi:10.5530/ijper.51.4s.106
60. Bangka P, Roanisca O, Mahardika G. Ekstrak Aseton Pucuk Iding-Iding (*Stenochlaena*). Published online 1800.
61. Suhartono E, Viani E, Rahmadhan MA, Gultom IS, Rakhman MF, Indrawardhana D. Total flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian. *APCBEE Procedia*. 2012;4:235-239. doi:10.1016/j.apcbee.2012.11.039
62. Numanovich AI, Abbosxonovich MA. a comprehensive review of herbal face serum. *EPRA International Journal of Multidisciplinary Research (IJMR)-Peer Reviewed Journal*. 2020;(2):198-210. doi:10.36713/epra2013
63. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083974
64. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatolobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6). doi:10.3390/nu11061341
65. 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
66. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan: Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. JKK. 2017;4(1):39-48.
67. Shanbhag S, Nayak A, Narayan R, Nayak UY. Anti-aging and sunscreens: Paradigm shift in cosmetics. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(3):348-359. doi:10.15171/apb.2019.042

68. Sulistyaningtyas¹ F, Diasturi² N. Formulasi dan Evaluasi Fisik Sediaan Gel Ekstrak Kulit Kentang dengan Kombinasi Basis Karbopol 940 dan HPMC. *PharmaCine: Journal of Pharmacy, Medical and Health Science*. Published online 2021;15. <https://journal.unsika.ac.id/>
69. Adawiyah R, Umaternate A, Suryadini H, Abrar A, Cahyani D, Alfirdaus S. Uji Aktivitas Antihiperlipidemia Ekstrak Etanol Daun Kalakai (*Stenochlaena palutris* (Burm.F.) Bedd Pada Tikus Putih Wistar Secara In vivo. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 2023;4(1).
70. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016;5. doi:10.1017/jns.2016.41
71. Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012;45(2):364-373. doi:10.4103/0970-0358.101319
72. Gurtner G, Wong VW. Wound healing: normal and abnormal. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 2007;6:15-22.
73. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
74. Fujiwara T, Duscher D, Rustad KC, et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency impairs wound healing in advanced age by reducing neovascularization and fibroblast function. *Exp Dermatol*. 2016;25(3):206-211. doi:10.1111/exd.12909
75. Setyawan P. Formulasi dan Uji Antioksidan Sediaan Serum Wajah Ekstrak Etanol. 2023;2(1):50-59.
76. Luo CW, Chen SP, Chiang CY, et al. Association between Ultraviolet B Exposure Levels and Depression in Taiwanese Adults: A Nested Case–Control Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(11):1-13. doi:10.3390/ijerph19116846
77. Howe PH, Limper AH. *Detection of TGFβ in Body Fluids and Tissues. Transforming Growth Factor-Beta Protocols*. Vol 142.; 2000.
78. Lestari NE, Pratama R. Mutu fisik sediaan masker gel peel-off ekstrak kulit buah delima (*punica granatum L*) dengan perbandingan konsentrasi PVA. *Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang*. Published online 2020:1-10.
79. Frontiñan-Rubio J, Llanos-González E, González VJ, Vázquez E, Durán-Prado M. Subchronic Graphene Exposure Reshapes Skin Cell Metabolism. *J Proteome Res*. 2022;21(7):1675-1685. doi:10.1021/acs.jproteome.2c00064

80. Widiyanto B, Yuniarifa C, Purnamasari R. Efek Perlindungan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Terhadap Densitas Kolagen Dari Paparan Sinar UVB. *Jurnal Sehat Indonesia (JUSINDO)*. 2022;16(1):1-23.
81. Oksal E, Ayuchecaria N, Agnestisia R, et al. Review article: Antioxidant in Kalakai (*Stenochlaena palustris*). *Alotrop*. 2023;7(2):1-9. doi:10.33369/alo.v7i2.29209
82. Lee HC, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF. Cutting Edge: Inhibition of NF- κ B-Mediated TSLP Expression by Retinoid X Receptor. *The Journal of Immunology*. 2008;181(8):5189-5193. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5189
83. Wente W, Brenner MB, Zitzer H, Gromada J, Efanov AM. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology*. 2007;148(4):1843-1849. doi:10.1210/en.2006-1247
84. Karangan CB, Prabowo WC, Agustina R. Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Kelakai Merah (*Stenochlaena palustris* (Burm F.) Bedd) Berbantu Ultrasonik. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. 2023;18:33-38. doi:10.25026/mpc.v18i1.700
85. Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H. Penetapan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F.) Bedd.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *J Res Kefarm Indones*. 2019;1(1):11-20. doi:10.33759/jrki.v1i1.46.