

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT
DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP
EKSPRESI Nrf2 dan KADAR SOD
(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Tikus Wistar Yang Dipapar
Sinar UVB Akut)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Magister Ilmu Biomedik

Ariesta Sari

MBK2321010342

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK KULIT DELIMA (*Punica granatum*) TERHADAP EKSPRESI Nrf2 dan KADAR SOD

(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Tikus Wistar Yang Dipapar
Sinar UVB Akut)

disusun oleh:
Ariesta Sari
MBK2321010342

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

Pembimbing 1



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF
NIK. 210199049

Pembimbing 2



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

Mengetahui,

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



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

SURAT PERNYATAAN

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

Semarang, 15 Mei 2025



Ariesta Sari
MBK.23.21.010342

KATA PENGANTAR

Puji syukur keadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan hasil tesis dengan judul, Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Kulit Delima (*Punica granatum*) Terhadap Ekspresi Nrf2 dan Kadar SOD Studi Eksperimental *in vivo* Pada Tikus Wistar Yang Dipapar Sinar UVB Akut.

Pada penyusunan hasil tesis ini peneliti mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, peneliti ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik, Sekaligus memberikan dorongan, semangat sebagai pembimbing I.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik telah membirikan arahan, semangat bimbingan, masukan selama penyusunan hasil tesis.
4. Prof. Dr. Dra. Atina Husaana, Msi. Apt selaku pembimbing II yang juga memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan selama penyusunan hasil tesis.

5. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med, Dr.dr. Eko Setiawan, Sp.B.,FINACS dan Dr. dr. Hj Chodidjah, M.Kes sebagai dosen penguji I,II dan III yang banyak membantu dan memberikan kritik serta saran kepada peneliti.
6. Keluarga yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga hasil tesis ini dapat disidangkan.

Manusia tidak luput dari kesalahan karena tidak ada manusia yang sempurna, untuk itu penyusun berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan hasil tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Prody Magister Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin



Semarang, Mei 2025


Ariesta Sari
MBK.23.21.010342

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Originalitas Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Nuclear Factor Erythroid-2 related Factor 2 (Nrf2)</i>	7
2.1.1 Struktur dan regulasi Nrf2.....	7
2.1.2 Fungsi Nrf2.....	8
2.1.3 Ekspresi Nrf2 pada peradangan dan faktor yang mempengaruhinya ...	10
2.1.4 Ekspresi Nrf2 pada kulit akibat paparan UVB	12
2.2 <i>Superoxide dismutase (SOD)</i>	15
2.2.1 Mekanisme kerja SOD.....	16
2.3 Delima (<i>Punica granatum</i>).....	18
2.3.1 Kandungan dan manfaat kulit delima	20
2.4 Pengaruh pemberian gel ekstrak kulit delima (EKD) terhadap ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada kulit yang dipapar sinar UVB	21
BAB III Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis.....	24
3.1 Kerangka teori	24
3.2 Kerangka konsep	27

3.3 Hipotesis Penelitian.....	27
BAB IV METODE PENELITIAN	28
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	28
4.2. Populasi dan Sampel	29
4.2.1. Populasi.....	29
4.2.2. Jumlah Sampel.....	29
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	29
4.3.1. Variabel.....	29
4.3.2. Definisi Operasional	30
4.4 Bahan atau Materi Penelitian	31
Bahan penelitian terbagi tiga: pembuatan ekstrak (kulit ... qdelima, etanol 70%), perlakuan (mencit, pakan, air minum), dan pemeriksaan (berbagai <i>diluent</i> , <i>antibodi</i> , <i>buffer</i> , dan larutan kimia lainnya).	31
4.5 Peralatan	31
4.6 Cara Penelitian dan Alur kerja	31
4.6.1 <i>Ethical Clearance</i>	31
4.6.2 Cara Pembuatan Ekstrak kulit delima.....	31
4.6.3 Pembuatan sediaan gel ekstrak kulit delima.....	32
4.6.4 Persiapan Hewan Uji	32
4.6.5 Paparan UV B	32
4.6.6 Pengambilan Sampel Jaringan	33
4.6.7 Validasi paparan UVB dengan pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i>	33
4.6.8 Prosedur preparasi jaringan kulit untuk analisis ekspresi Nrf2 dengan metode qRT-PCR.....	34
4.6.9 Prosedur diagnosis ekspresi Nrf2 metode qRT-PCR	35
4.6.10 Prosedur preparasi jaringan kulit untuk pengukuran kadar SOD metode ELISA	35
4.6.11 Prodesur pengukuran kadar SOD metode ELISA	37
4.7 Alur Penelitian.....	39
4.8 Metode Analisis Data	40
4.9 Tempat dan Waktu Penelitian	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
5.1 Hasil Penelitian.....	41
5.1.1 Hasil analisis ekspresi Nrf2 jaringan kulit tikus yang dipapar sinar UVB akut.....	41

5.1.2 Hasil analisis kadar SOD jaringan kulit tikus yang dipapar sinar UVB akut.....	43
5.1.3 Hasil validasi histologi jaringan kulit dengan pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i>	46
5.2 Pembahasan	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	53
6.1. Kesimpulan.....	53
6.2. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
DAFTAR LAMPIRAN.....	59
1. Surat Keterangan Penelitian dan Hasil Analisis	59
2. Lampiran SPSS.....	62
3. Surat izin etik penelitian	67
4. Dokumentasi kegiatan penelitian	68



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Aktivasi Nrf2 pada inflamasi.	11
Gambar 2.2 Aktivasi SOD akibat paparan UV.	18
Gambar 2.3 Buah delima.....	19
Gambar 2.4 Gambaran umum jalur Nrf2.	68
Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori.....	26
Gambar 3.2 Skema Kerangka konsep.....	27
Gambar 4.1. Skema Rancangan penelitian	28
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	39
Gambar 5.1 Grafik rerata dan <i>Post hoc</i> LSD Nrf2 ($*=p<0,05$).....	43
Gambar 5.2 Grafik rerata dan <i>Post hoc</i> tamhane SOD ($*=p<0,05$).....	45
Gambar 5.3 Hasil histologi jaringan kulit dengan pewarnaan <i>Masson's Trichrome</i> pada mikroskop perbesaran 400x.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 5.1 Hasil penelitian ekspresi Nrf2 jaringan kulit	41
Tabel 5.2 Hasil uji <i>Post hoc LSD</i> ekspresi Nrf2 antar kelompok penelitian.....	42
Tabel 5.3 Hasil penelitian kadar SOD.....	44
Tabel 5.4 Hasil uji <i>Post hoc Tamhane</i> Kadar SOD jaringan kulit.....	45



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan sinar UVB berlebih menyebabkan penuaan kulit yang dianggap sebagai masalah estetika yang dapat mengakibatkan kelainan kulit sehingga berdampak pada psikologis. Pemberian ekstrak buah delima dapat menurunkan reaksi inflamasi, serta mampu menghentikan indikasi apoptosis dengan meningkatkan kadar *superoksida dismutase* (SOD). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah gel dari ekstrak kulit delima bisa memengaruhi tingkat Nrf2 dan SOD pada tikus Wistar yang terkena sinar UV-B secara tiba-tiba.

Metode: Penelitian ini melibatkan 28 tikus Wistar yang dibagi dalam empat kelompok, termasuk kelompok kontrol dan kelompok yang diberi gel EKD dengan dosis berbeda setelah paparan sinar UVB. Setelah 7 hari perlakuan, kulit tikus dianalisis untuk melihat ekspresi Nrf2 dan kadar SOD. Data diuji menggunakan *Kruskal-Wallis* dan *ANOVA* satu arah.

Hasil: Analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi Nrf2 dan kadar SOD berbeda signifikan antar kelompok ($p = 0,000$). Kelompok K4 memiliki ekspresi Nrf2 dan kadar SOD tertinggi, sedangkan kelompok K2 mencatat kadar SOD terendah dan kelompok K3 menunjukkan ekspresi Nrf2 paling rendah.

Kesimpulan: Pemberian gel EKD berpengaruh signifikan terhadap ekspresi Nrf2 dan kadar SOD. Dosis gel EKD 20% mempunyai efek yang lebih baik dari pada dosis gel EKD 10%.

Kata Kunci: Paparan UVB akut, Ekspresi Nrf2, Kadar SOD, dan gel Ekstrak kulit delima

ABSTRACT

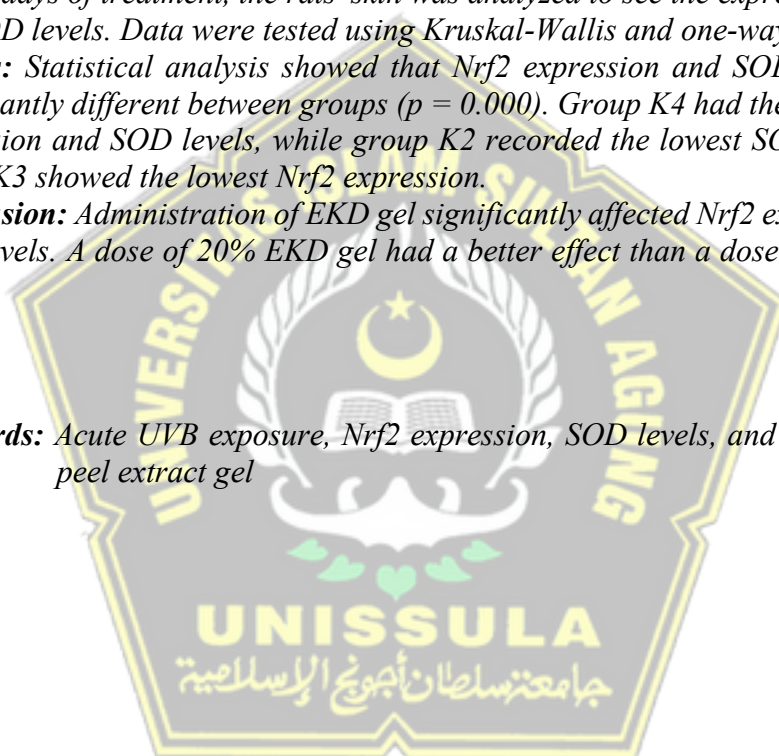
Background: Excessive UVB exposure causes skin aging which is considered an aesthetic problem that can cause skin disorders that have an impact on psychology. Giving pomegranate extract can reduce inflammatory reactions, and is able to stop indications of apoptosis by increasing superoxide dismutase (SOD) levels. This study was conducted to determine whether gel from pomegranate peel extract could affect Nrf2 and SOD levels in Wistar rats suddenly exposed to UV-B light.

Method: This study involved 28 Wistar rats divided into four groups, including a control group and a group given EKD gel with different doses after UVB exposure. After 7 days of treatment, the rats' skin was analyzed to see the expression of Nrf2 and SOD levels. Data were tested using Kruskal-Wallis and one-way ANOVA.

Results: Statistical analysis showed that Nrf2 expression and SOD levels were significantly different between groups ($p = 0.000$). Group K4 had the highest Nrf2 expression and SOD levels, while group K2 recorded the lowest SOD levels and group K3 showed the lowest Nrf2 expression.

Conclusion: Administration of EKD gel significantly affected Nrf2 expression and SOD levels. A dose of 20% EKD gel had a better effect than a dose of 10% EKD gel.

Keywords: Acute UVB exposure, Nrf2 expression, SOD levels, and pomegranate peel extract gel



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sinar UVB berlebih dapat mempercepat penuaan kulit, ditandai oleh epidermis yang menebal, kolagen yang terdegradasi, dan hilangnya lemak bawah kulit.¹ Gejala yang paling mudah dikenali adalah kemerahan atau kulit terbakar karena sinar matahari.² Penuaan dianggap sebagai masalah *aesthetic* yang dapat mengakibatkan kelainan kulit sehingga berdampak pada psikologis.³ Diperlukan alternatif perawatan kulit alami yang lebih aman dan minim efek samping.⁴ Salah satu herbal yang bisa dimanfaatkan adalah buah delima. Kulit buah delima kaya akan antioksidan, polifenol, serta adanya kandungan fitokimia asam ellagic dan punicalagin.⁵ Pemberian ekstrak buah delima dapat menurunkan reaksi inflamasi, serta mampu menghentikan indikasi apoptosis dengan meningkatkan kadar *superoksida dismutase* (SOD).^{6,7} Penggunaan gel ekstrak kulit delima dilaporkan memberikan efek antimelanogenesis, secara signifikan menurunkan kandungan melanin dan mencerahkan kulit.⁸

Peningkatan radiasi UVB dalam 50 tahun terakhir disebabkan oleh aktivitas di luar ruangan.⁹ Paparan UVB merusak dan mengurangi produksi kolagen sehingga menyebabkan penuaan dini, kerutan, dan kehilangan elastisitas kulit. Prevalensi penurunan kolagen di negara tropis cukup signifikan karena paparan sinar UVB yang berkelanjutan. Meningkatkan risiko penurunan kolagen, perawatan kulit yang tepat sangat penting untuk mengurangi efek paparan UVB terhadap kolagen dan kesehatan kulit secara keseluruhan. Upaya pencegahan ini dapat

membantu menjaga kekencangan kulit dan mengurangi risiko penuaan.¹⁰

Pengobatan anti penuaan berkembang dengan sangat pesat.¹¹ Penggunaan kosmetik yang meningkat di berbagai negara termasuk Indonesia, mendorong pengembangan produk kosmetik yang digunakan sesuai dengan kebutuhan konsumen.¹² Terapi pada kondisi dermatologis dengan topikal konvensional dapat mengubah warna kulit menjadi lebih gelap, menimbulkan efek dermatitis alergi dan okronosis.¹³ Produk kosmetik berbahan sintetis dapat menyebabkan iritasi kulit seperti terbakar, dan mengelupas.¹⁴ Penelitian melaporkan dengan uji efek ekstrak kulit delima terhadap perubahan kulit terkait eritema dan pigmentasi melanin selama 12 minggu, dilaporkan penurunan kandungan melanin dan eritema kulit yang signifikan, efek antioksidan dan anti-inflamasi pada ekstrak kulit delima dapat diterapkan lebih lanjut dalam pengelolaan gangguan pigmentasi kulit. Analisis pada efek mencerahkan kulit dari ekstrak kulit delima yang kaya fenolik dibuat dalam bentuk gel dan masker. Efek positif terhadap hiperpigmentasi terlihat setelah satu minggu.⁸ Menurut berbagai penelitian mengungkapkan potensi kulit buah sebagai sumber yang kaya akan senyawa bioaktif dengan beragam efek farmakologis.⁵

Beberapa molekul yang ditemukan dalam ekstrak kulit delima berhubungan dengan proses inflamasi. Analisis efek anti-inflamasi pada kulit delima pada makrofag dengan komponen utamanya *punicalagin* (PC) dan *asam ellagic* (EA), dapat menurunkan sitokin pro-inflamasi (TNF- α , IL-1 β dan IL-6) pada tingkat mRNA dan protein serta menurunkan regulasi iNOS dan ekspresi COX-2, serta mengurangi NO dan PGE2..¹⁵ Sejalan dengan penelitian tersebut, kulit buah delima

mampu menyebabkan terhentinya siklus sel dan meningkatkan sel dengan DNA terfragmentasi, yang mengindikasikan induksi apoptosis. Peningkatan signifikan pada kadar *superoksida dismutase* (SOD), *glutathione* (GSH), dan *katalase* (CAT) dan penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) secara simultan setelah pemberian ekstrak kulit delima.⁶

Penelitian lainnya menggunakan gel yang mengandung ekstrak etanol 2% dan 10% menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang lebih baik, menggambarkan potensi yang sangat baik dari terapi menggunakan formulasi ekstrak kulit delima pada penyembuhan kulit, dengan meningkatkan deposisi kolagen dan penurunan reaksi inflamasi.⁷ Pemilihan kulit buah delima diketahui memiliki kandungan yang lebih tinggi konsentrasi komponen aktif dibandingkan bagian lainnya.⁶ Pada penelitian ini sediaan yang dipilih adalah sediaan gel yang diharapkan dapat mendukung efek ekstrak kulit delima, dengan parameter yang akan diamati yaitu ekspresi Nrf2 dan kadar SOD.

1.2 Rumusan Masalah

Sejauh mana gel ekstrak kulit delima (EKD) berperan dalam memodifikasi ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar yang dipaparkan sinar UV-B secara tiba-tiba?.

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Meneliti pengaruh gel EKD terhadap Nrf2 dan SOD pada tikus Wistar yang terkena paparan sinar UV-B akut.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengevaluasi variasi ekspresi Nrf2 pada tikus Wistar terpapar sinar UV-B akut yang diberikan gel ekstrak kulit delima dosis 10% dan 20%
- b. Untuk mengevaluasi variasi ekspresi SOD pada tikus Wistar terpapar sinar UV-B akut yang diberikan gel ekstrak kulit delima dosis 10% dan 20%

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Studi ini bertujuan untuk melihat apakah EKD bisa meningkatkan ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar setelah mereka terpapar sinar UV-B akut.

1.4.2 Manfaat Praktis

Menginformasikan manfaat EKD dalam mengatasi dampak terhadap kulit dari paparan UV-B akut, sehingga EKD dapat diaplikasikan oleh masyarakat untuk digunakan secara klinis untuk perawatan kulit akibat terpapar sinar UV-B akut.

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1	Du L, Li J, Zhang X, Wang L, Zhang W. ¹⁵	<i>Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of MAPKs</i>	Ekperim ent <i>In Vivo</i>	Pemberian ekstrak kulit delima secara oral yang kaya akan polifenol, termasuk punicalagin dan asam ellagic, memiliki aktivitas antiinflamasi yang kuat, mengurangi sitokin proinflamasi, memodifikasi sinyal MAPK, dan menghambat produksi COX-2 dan iNOS, yang semuanya memberikan bukti

		activation.		potensinya sebagai senyawa antiinflamasi yang kuat.
2	Karim S, Alkreathy HM, Ahmad A, Khan MI. ¹⁶	<i>Effects of Methanolic Extract Based-Gel From Saudi Pomegranate Peels With Enhanced Healing Potential on Excision Wounds in Diabetic Rats</i>	Ekperim ent <i>In Vivo</i>	Produksi dan pemecahan kolagen dimediasi oleh TGF- β 1. VEGF cenderung mempengaruhi kejadian patologis, termasuk penyembuhan jaringan, yang melibatkan neovaskularisasi dan perubahan permeabilitas pembuluh darah. EGF merangsang mitosis sel epitel dan kemotaksis, sehingga meningkatkan epitelisasi. Tikus yang diberi secara topikal dengan <i>Saudi Pomegranate peel extract</i> (SPPE) menunjukkan peningkatan pada tingkat ekspresi VEGF dan konten EGF. Temuan histologis menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam laju pembentukan fibroblas, epitelisasi, dan granulasi pada kelompok yang diberi perlakuan.
3	Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. ¹⁷	<i>Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin</i>	Ekperim ental <i>In Vivo</i>	Ekstrak Kulit Delima yang dioleskan pada kulit terbukti mengurangi COX-2, memberikan efek anti-inflamasi yang nyata. Ini berarti PRE bisa menembus kulit dan mengatur COX-2 di epidermis, sehingga berpotensi meredakan peradangan dan nyeri pada masalah kulit seperti luka.
4	Parveen R, Akhtar N, Mahmood T. ¹⁸	<i>Topical microemulsion containing Punica granatum extract: Its control over skin erythema and melanin in healthy Asian subjects.</i>	Eksperi men <i>ex vivo</i>	Formulasi topikal mikroemulsi menggunakan ekstrak <i>Punica granatum</i> dapat menurunkan kandungan melanin kulit dan kejadian eritema yang signifikan. Dapat diterapkan lebih lanjut dalam pengelolaan gangguan pigmentasi kulit.
5	Kanlayavat tanakul M, Chongnativ isit W, Chaikul P, Lourith N. ⁸	<i>Phenolic-rich Pomegranate Peel Extract: In Vitro, Cellular, and in Vivo Activities for</i>		Pencerah kulit wajah dan penurunan kandungan melanin secara signifikan dilaporkan setelah penggunaan gel dan masker yang mengandung 0,2% ekstrak kulit PG karena efek antimelanogenesisnya.

		<i>Skin Hyperpigmentati on Treatment.</i>	
6	Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. ¹⁹	<i>Evaluation of the Potential of Whole Pomegranate (Punica granatum) Fruit Extract in Healing Skin Burns in Rats (Rattus norvegicus)</i>	Ekperim Salep dari ekstrak delima standar ental. <i>In</i> (PSE) dengan 40% asam ellagic <i>Vivo</i> mempercepat penyembuhan luka bakar derajat dua. Ini menunjukkan bahwa PSE adalah ramuan yang menjanjikan untuk pengobatan luka bakar kulit.
7	Shinde V, Shinde VM, Shende A, Mahadik K. ⁷	<i>Evaluation of antioxidant and wound healing potential of pomegranate peel gel formulation</i>	Ekperim Perawatan luka dengan gel yang ental <i>In</i> mengandung ekstrak etanol 2% dan <i>Vivo</i> 10% menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang lebih baik dibandingkan kontrol positif.

Dari penelitian sebelumnya dan percobaan baru kami, ada kesamaan dan perbedaan. Intinya, kami semua mau membuat produk herbal dari kulit delima yang bisa meredakan radang dan melindungi kulit dari sinar UV. Yang paling mirip adalah pemakaian ekstrak kulit delima itu sendiri, yang memang bagus untuk produk kulit.

Dalam studi ini, kami secara khusus melihat ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar setelah terpapar UV-B. Penelitian ini penting dalam pemahaman tentang efek gel ekstrak kulit delima (EKD) pada kondisi *photoaging* yang dipapar UV-B, diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah dan praktis bagi pengembangan obat herbal berbasis kulit delima untuk kulit sebagai agen fotoprotektif terhadap sinar UV-B akut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Nuclear Factor Erythroid-2 related Factor 2 (Nrf2)*

2.1.1 Struktur dan regulasi Nrf2

Nrf2, anggota subfamili *Cap 'n' Collar* (CNC), terdiri dari tujuh domain fungsional (Neh1-Neh7). Neh1 berperan dalam pembentukan ikatan dengan protein lain seperti Maf dan DNA, serta enzim UbcM2 untuk membentuk kompleks inti sel. Domain Neh2 mengandung motif DLG dan ETGE yang krusial untuk interaksi Nrf2 dengan Keap1, yang berfungsi sebagai penghambat aktivitas Nrf2.²⁰

Keap1 menonaktifkan Nrf2 dalam kondisi normal dengan memicu penghancurannya. Namun, saat sel stres (misalnya karena radikal bebas), Keap1 berubah, melepaskan Nrf2. Nrf2 yang terbebas ini kemudian menjadi aktif dan tidak lagi dihancurkan. Kemudian Nrf2 ditranslokasi ke dalam nukleus, diheterodimerisasi dengan protein Maf kecil, dan mentransaktivasi baterai gen ARE (Fig.1A). Neh3, Neh4, dan Neh5 pada Nrf2 berfungsi sebagai pengaktif gen. Neh3 berinteraksi dengan CHD6, sedangkan Neh4 dan Neh5 berikatan dengan CBP dan kofaktor RAC3/AIB1/SRC-3 untuk meningkatkan ekspresi gen target Nrf2. Khususnya, Neh5 juga penting untuk lokasi dan pengaturan Nrf2 dalam sel berkat sinyal ekspor nuklir peka-redoksnya.²⁰

Protein Nrf2 pada manusia memiliki panjang 605 asam amino dan mengandung tujuh daerah yang sangat terkonservasi yang dikenal sebagai domain homologi Nrf2-ECH (Neh). Neh1 mengandung daerah bZIP CNC, yang

diperlukan untuk pengikatan DNA dan juga memediasi hetero-dimerisasi dengan mitra transkripsinya, terutama sMaf. Domain Neh2 telah diidentifikasi sebagai domain pengatur negatif dan secara khusus mengikat penghambat Nrf2 Keap1 melalui motif DLG dan ETGE. Domain Neh2 juga mengandung tujuh residu lisin yang penting untuk ubiquitinasi dan degradasi proteasomal Nrf2 berikutnya. Domain Neh3, Neh4, dan Neh5 berperan dalam aktivasi transkripsi gen yang digerakkan oleh Nrf2. Domain Neh6 merupakan area kaya serin yang terlibat dalam regulasi negatif stabilitas Nrf2, terlepas dari Keap1. Domain tersebut berisi motif DSGIS dan DSAPGS yang dikenali oleh β -transducing repeat-containing protein (β -TrCP). Domain Neh7 berperan dalam represi aktivitas transkripsi Nrf2 oleh retinoid X receptor α (RXR- α) melalui asosiasi fisik antara kedua protein tersebut. Seperti yang ditunjukkan dalam analisis terperinci, aktivitas Nrf2 dikontrol ketat oleh faktor (protein) positif dan negatif dan dapat diatur melalui stabilitas Nrf2, modifikasi pascatranskripsi, dan ketersediaan mitra pengikat.²¹

2.1.2 Fungsi Nrf2

Untuk menangkal efek merugikan dari kerusakan eksogen, sel mamalia telah mengembangkan hierarki mekanisme penginderaan dan pensinyalan yang canggih. Salah satu respons seluler protektif utama adalah aktivasi faktor transkripsi Nrf2. Nrf2 dikodekan oleh gen NFE2L2 dan merupakan anggota subfamili "Cap'n'Collar" (CNC) dari faktor transkripsi basic leucine zipper (bZIP), yang juga mencakup protein Nrf1 dan Nrf3 terkait, serta p45 faktor nuklir yang berasal dari eritroid 2 (p45 NF-E2), faktor transkripsi domain BTB

dan homolog CNC 1 (Bach1) dan 2 (Bach2). Protein-protein ini memerlukan protein leusin ritseting lainnya, seperti *small musculo-aponeurotic fibrosarcoma proteins* (sMaf), protein Jun, atau c-Fos agar berfungsi. Setelah heterodimerisasi dengan mitra interaksi ini, Nrf2 mengikat DNA dengan urutan karakteristik 5'-TGACNNNGCA-3' pada promotor gen target, yang disebut ARE atau EpRE.²²

Pengikatan heterodimer Nrf2 ke urutan ARE menghasilkan aktivasi transkripsi sejumlah gen. Dilaporkan bahwa Nrf2 memiliki lebih dari 500 gen target termasuk, misalnya, protein yang penting untuk keseimbangan redoks, sitoproteksi, detoksifikasi fase II, metabolisme karbohidrat, lipid dan heme/zat besi, transporter, faktor pertumbuhan, dan kelangsungan hidup sel.²³ Sistem antioksidan dan detoksifikasi tubuh melibatkan banyak pemain, seperti NQO1, EPHX1, CBR1, UGT, ABC transporters, enzim yang membuat dan menggunakan GSH (GCLC, GCLM, GST, GSR, GPX), TrxR, TRX, PRX, dan HO-1. Nrf2 adalah regulator utama dari respons sitoprotektif, yang aktivitasnya dipengaruhi oleh Keap1 atau p62.²²

Ekspresi gen yang mengkode katalase (CAT) dan superoksida dismutase 1 (SOD1) tampaknya juga berada di bawah kendali Nrf2, seperti yang ditunjukkan oleh percobaan pada tikus knockout Nrf2 (Chan dan Kan 1999). Nrf2 berperan sebagai agen anti-inflamasi dengan mengurangi sel-sel inflamasi dan mengatur gen yang pro- dan anti-inflamasi (misalnya, IL-10 vs. IL-6, IL-1 β). Menariknya, TNF- α memiliki efek ganda pada jalur Nrf2: konsentrasi tinggi menekan protein antioksidan, sementara kadar rendah justru bersifat protektif.²⁴

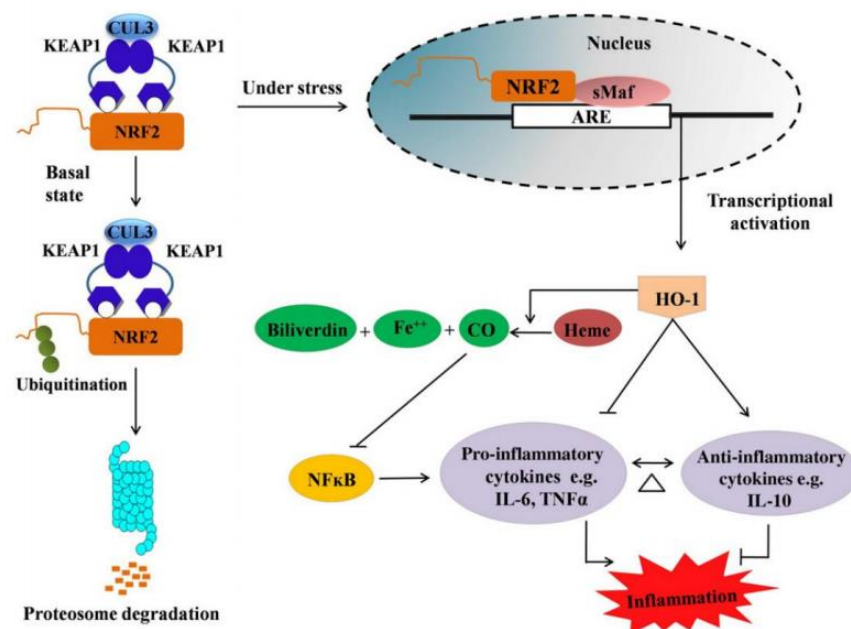
Jalur Nrf2/Keap1 mengatur berbagai gen dan fungsi yang terlibat dalam pengaturan stres oksidatif, peradangan, pengenalan kerusakan DNA, dan masih banyak lagi. Jalur Nrf2/Keap1 biasanya dirangsang oleh stres oksidatif dan diaktifkan dengan cara yang bergantung pada dosis. Nrf2 biasanya ditemukan di sitosol, terkait dengan protein penghambat terikat aktinnya, Keap1, dalam kondisi fisiologis normal. Setelah diaktifkan oleh stres oksidatif, Nrf2 yang baru disintesis berpindah ke nukleus dan mengalami heterodimerisasi dengan protein homolog onkogen fibrosarkoma muskuloaponeurotik kecil (Maf). Kompleks Nrf2/Maf mengaktifkan ekspresi gen elemen respons antioksidan (ARE), yang mengatur beberapa protein antioksidan dan sitoprotektif. Nrf2 sebaliknya dihambat oleh Keap1 dalam kondisi oksidatif normal. Protein target Nrf2 meliputi glutathione dan regenerasinya, superoxide dismutase, HO-1, dan NF- κ B. Dalam kondisi hiperglikemia, enzim antioksidan yang diatur oleh Nrf2 mengalami penurunan ekspresi pada sel retina Müller tikus, termasuk penurunan aktivitas katalase dan glutathione. Hiperglikemia tampaknya menurunkan kemampuan Nrf2 untuk mengikat protein Maf yang terletak di nukleus, yang secara keseluruhan menyebabkan gen target Nrf2 mengalami penurunan regulasi.²⁵

2.1.3 Ekspresi Nrf2 pada peradangan dan faktor yang mempengaruhinya

Peradangan adalah respons kompleks tubuh terhadap infeksi atau cedera, melibatkan sel imun dan molekul, dengan tujuan membersihkan kerusakan dan memulai perbaikan. Ada dua jenis: akut (bermanfaat dan sementara) dan kronis (berkepanjangan dan seringkali patologis, berperan dalam banyak penyakit

kronis termasuk kanker, yang disebabkan oleh sel imun dan sitokin inflamasi). Jalur sinyal pro- dan anti-inflamasi saling berinteraksi dalam proses ini.²⁰

Ketika terjadi peradangan patologis, sel-sel imun seperti sel mast, monosit, makrofag, dan limfosit menjadi aktif dan bergerak ke area yang terluka. Ini menyebabkan produksi ROS yang merusak, serta mediator inflamasi seperti sitokin, kemokin, dan prostaglandin. Mediator ini kemudian merekrut lebih banyak makrofag dan mengaktifkan jalur sinyal inflamasi klasik seperti NF- κ B, MAPK, dan JAK-STAT. Di sisi lain, Nrf2 adalah faktor transkripsi penting yang mengontrol gen antioksidan dan detoksifikasi (termasuk NQO1, GPx, HO-1), memberikan perlindungan seluler melalui tindakan anti-inflamasinya dan memengaruhi perjalanan penyakit.²⁰



Gambar 2.1 Aktivasi Nrf2 pada inflamasi.²⁰

Nrf2, yang biasanya dihambat oleh Keap1, dilepaskan saat stres oksidatif

untuk mengaktifkan gen seperti HO-1. HO-1 memecah heme menjadi CO (penghambat inflamasi) dan bilirubin (antioksidan), sehingga mengurangi sitokin pro-inflamasi dan meningkatkan sitokin anti-inflamasi untuk menyeimbangkan respons peradangan.²⁰

2.1.4 Ekspresi Nrf2 pada kulit akibat paparan UVB

Kulit menutupi tubuh dan banyak fungsi penting lainnya, memberikan perlindungan terhadap stresor lingkungan termasuk bahaya mekanis, fisik, biologis, dan kimia. Radiasi UVB adalah aktivator pada jalur yang digerakkan oleh Nrf2 pada fibroblas. Jaringan kulit mampu menghasilkan berbagai senyawa aktif biologis, seperti hormon dan neurotransmitter yang bekerja langsung di kulit serta di jaringan lain. Paparan sinar matahari penting untuk sintesis endogen melanin, pigmen yang mewarnai kulit dan penting dalam melindungi dari radiasi UVB. UVB merangsang kerusakan pada sel dan struktur kulit. Cedera ini berkisar dari eritema dan kulit terbakar hingga penuaan dini dan karsinoma. Karena perubahan gaya hidup dan menipisnya lapisan ozon, kulit terpapar UVB dalam jumlah yang lebih tinggi, dengan kecenderungan peningkatan kejadian gangguan kulit yang terkait dengan UVB. Namun, sel-sel kulit dilengkapi dengan beberapa mekanisme perlindungan yang mengurangi dampak negatif radiasi UVB. Salah satu mekanisme tersebut adalah aktivasi jalur pensinyalan Nrf2 yang mengendalikan homeostasis antioksidan seluler. Oleh karena itu, radiasi matahari UVB memodulasi jalur pensinyalan Nrf2 dan dengan demikian meningkatkan perlindungan terhadap radiasi matahari.²²

Radiasi meningkatkan dampak mutagenik UVB dengan menyebabkan

kerusakan oksidatif pada proteom, termasuk enzim perbaikan DNA, sehingga merusak sifat protektif, anti-mutagenik dan espon reparatif dari sel-sel yang rusak dan dengan demikian meningkatkan efek karsinogenetik UVB. ROS, produk teroksidasi, dan lesi DNA merangsang proses pertahanan dan penyembuhan yang mencakup ekspresi beberapa molekul pensinyalan, seperti sitokin, kemokin, protein kinase (misalnya mitogen-activated protein kinase (MAPK)), faktor transkripsi (misalnya faktor 2 terkait NF-E2 (Nrf2), NF κ B, dan AP-1), yang mengarah pada aktivasi jalur pensinyalan spesifik. Peristiwa ini diarahkan untuk memperkuat mekanisme perlindungan, perbaikan dan/atau eliminasi molekul yang rusak atau induksi kematian sel (apoptosis, nekrosis). Faktor kunci dalam kondisi sensitif redoks telah dikenali sebagai Nrf2.

Nrf2 penting untuk homeostasis kulit. Semua sel kulit manusia mengekspresikan Nrf2, namun kadar basal gen Nrf2 berbeda di antara sel-sel individual. Di antara jenis sel kulit, keratinosit menunjukkan tingkat ekspresi gen Nrf2 basal sekitar dua kali lipat lebih tinggi dibandingkan fibroblas dan melanosit. Pada epidermis, Nrf2 terdeteksi secara seragam dari lapisan basal hingga granular kulit manusia yang sehat. Namun, regulator negatif Nrf2 Keap1 sebagian besar ditemukan di lapisan basal dan lebih rendah di lapisan spinosus epidermis. Translokasi nuklir Nrf2 ke nukleus meningkat secara bertahap saat keratinosit berdiferensiasi, yang secara jelas menunjukkan pentingnya aktivasi Nrf2 selama diferensiasi keratinosit. Namun, pada epidermis tikus, gradien ekspresi dan aktivitas Nrf2 terdeteksi. Pada keratinosit suprabasal yang berdiferensiasi, ekspresi mRNA Nrf2 dan gen targetnya (NQO1, GCLC, GCLM,

GSR, dan sulfiredoxin 1) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dgn sel basal yg tdk berdiferensiasi.²²

Aktivitas Nrf2 yang beragam ini pada keratinosit yang berdiferensiasi secara beragam tampaknya penting dalam perlindungan kulit terhadap stresor lingkungan. Seperti yang ditunjukkan pada tikus yang disinari UVB, aktivitas Nrf2 yang rendah pada keratinosit basal, yang berfungsi sebagai sel induk, ditemukan untuk memastikan tingkat apoptosis yang tinggi, kemungkinan besar untuk menghindari proliferasi sel dengan DNA yang rusak dan dengan demikian mencegah penyebaran mutasi. Sebaliknya, pada keratinosit suprabasal, aktivitas Nrf2 tinggi dan mengakibatkan peningkatan ekspresi gen sitoprotektif untuk penjagaan sel, untuk menjaga integritas kulit/epidermal. Ekspresi Nrf2 juga ditemukan penting untuk penyembuhan luka kulit. Dalam proses ini, kadar Nrf2 diatur oleh KGF. Pada tikus knockout Nrf2, penyembuhan luka dikaitkan dengan peradangan yang berkepanjangan dengan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi (IL-1 β , TNF- α), tetapi tanpa kelainan histologis yang jelas. Kemajuan penyembuhan normal mungkin dikompensasi oleh peningkatan ekspresi Nrf3, faktor transkripsi terkait yang juga distimulasi oleh KGF. Selain sel epidermis dan dermal, Nrf2 juga diekspresikan dalam adiposit hipodermal. Awalnya, fungsi Nrf2 dalam adiposit terlibat dalam kontrol transkripsi enzim detoksifikasi seperti NQO1, GST, UGT dan sulfotransferase, yang memetabolisme xenobiotik yang dapat terakumulasi dalam jaringan adiposa. Kemudian, aktivitas Nrf2 ditemukan penting untuk regulasi, pembentukan dan fungsi adiposit termasuk metabolisme lipid dan sensitivitas adiposit terhadap insulin. Dengan demikian,

Nrf2 dapat mewakili target farmakologis baru untuk pengobatan obesitas dan gangguan klinis terkait. Di sisi lain, modifikasi genetik aktivitas Nrf2 (protein itu sendiri atau protein pengaturnya) dapat mengakibatkan adipogenesis dan metabolisme energi yang terpengaruh. Wang et al. mengulas topik tersebut secara kompleks dalam makalah terbaru.²⁶

Kadar Nrf2 yang tinggi juga terdeteksi dalam sel imun seperti monosit, neutrofil, makrofag, sel T, dan sel B yang bukan sel yang secara langsung berada di kulit tetapi penting untuk proses fisiologis dan patologis yang terjadi di kulit. Aktivasi Nrf2 dalam sel imun menghambat peradangan dengan menghambat faktor nuklir proinflamasi kappa B (NFκB) dan/atau transkripsi gen sitokin pro-inflamasi yang didorong oleh faktor nuklir ini. Aktivasi Nrf2 dalam sel imun dapat mengubah diferensiasi, ekspansi, dan kelangsungan hidup sel serta pelepasan sitokin.²²

Data keseluruhan pada tikus dan manusia menunjukkan peran ganda Nrf2. Sementara aktivasi jangka pendek sangat penting dalam perlindungan sel terhadap OS yang disebabkan oleh produksi berlebihan ROS/RNS, aktivasi Nrf2 konstitutif atau jangka panjang dalam epidermis merugikan karena peningkatan abnormal diferensiasi keratinosit. Demikian pula, untuk proses karsinogenik, pada tahap awal Nrf2 mampu melindungi sel terhadap proses karsinogenik melalui penurunan kadar ROS/RNS, sedangkan pada tahap selanjutnya Nrf2 meningkatkan proliferasi sel kanker dan resistensi terhadap kemoterapi obat.²²

2.2 Superoxide dismutase (SOD)

Sebagai mekanisme perlindungan, tubuh memproduksi antioksidan untuk

melawan ROS. Antioksidan merupakan molekul yang menghambat oksidasi, bahkan pada konsentrasi rendah.²⁷ Antioksidan melawan oksidasi dengan berbagai cara, termasuk mengikat ion logam, menetralkan radikal bebas, dan memperbaiki kerusakan. Mereka bekerja dengan mendonorkan atau menerima elektron. Antioksidan terbagi dua: enzimatik (misalnya, katalase, GSH peroksidase, SOD di kulit) dan non-enzimatik (misalnya, ubikuinon, vitamin C, E, dan A).²⁷

SOD adalah metaloenzim antioksidan endogen yang mengubah radikal superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 . Enzim ini stabil pada suhu rendah dan pH basa, namun tidak tahan panas. Sebagai antioksidan sekunder, SOD berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah pembentukan radikal baru.²⁸ Tubuh memiliki tiga isoform SOD berbeda (SOD1 sitosol, SOD2 mitokondria, SOD3 ekstraseluler) yang semuanya mengubah anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. SOD yang banyak diekspresikan di sitoplasma, penting untuk melindungi sel dari stres oksidatif.²⁹

2.2.1 Mekanisme kerja SOD

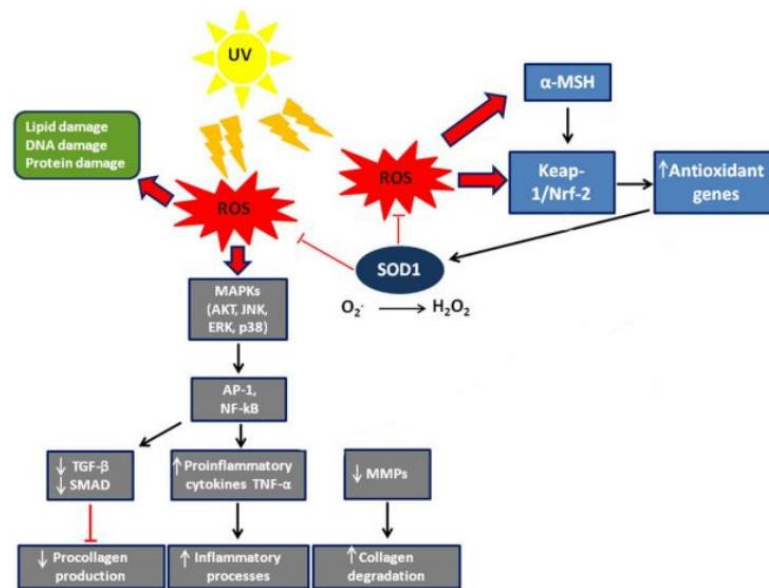
Sistem antioksidan kulit manusia, yang mencakup enzim seperti SOD (menghasilkan H_2O_2 kurang reaktif) serta Katalase dan Glutation Peroksidase (memecah H_2O_2 menjadi air dan oksigen), bekerja sama melindungi kulit dari ROS.²⁷ Tubuh menghasilkan antioksidan sebagai pertahanan melawan spesies oksigen reaktif (ROS). Molekul ini mencegah oksidasi bahkan dalam konsentrasi rendah.²⁷ Antioksidan melawan oksidasi dengan berbagai cara, termasuk menetralkan ROS dan menstabilkan radikal bebas melalui transfer elektron. Mereka diklasifikasikan sebagai enzimatik (contohnya katalase, GSH

peroksidase, SOD di kulit) atau non-enzimatis (seperti ubiquinone, vitamin C, E, A).²⁷

ROS berlebih yang dihasilkan sel kulit dapat merusak dan mengaktifkan jalur sinyal inflamasi (MAP, NF- κ B, AP-1), menghambat prokolagen, dan meningkatkan pemecahan kolagen. Namun, ROS juga memicu Nrf2 (dengan mengatasi Keap1) dan α -MSH, yang pada gilirannya mengaktifkan Nrf2 untuk memicu transkripsi gen antioksidan di berbagai sel kulit, termasuk fibroblas.^{30,31}

Kadar ROS yang persisten dan tinggi merusak sel hingga menyebabkan kematian. SOD3, isoenzim SOD di dinding arteri dan kulit (dermis, epidermis), penting karena membersihkan superoksida dan meningkatkan aktivitas oksida nitrat, yang menjaga fungsi pembuluh darah. Kehilangan SOD3 dapat memicu peradangan.³²

SOD menghambat produksi ROS akibat UVB, yang kemudian mengurangi sintesis melanin melalui jalur seperti Wnt7a/ β -catenin, MC1R/PKA, protein kinase C, dan ET-1/endothelin B. Selain itu, penekanan tirosinase dan MITF juga berkontribusi pada efek ini.³³



Gambar 2.2 Aktivasi SOD akibat paparan UV.³¹

ROS berlebih di sel kulit menyebabkan kerusakan, memicu peradangan, menghambat prokolagen, dan mempercepat kerusakan kolagen. Namun, ROS juga mengaktifkan Nrf2 (dengan mengatasi penghambatnya dan melalui α -MSH), yang kemudian mengaktifkan gen antioksidan di berbagai sel kulit, termasuk fibroblas, untuk melindungi sel.^{30,31}

2.3 Delima (*Punica granatum*)

Delima (*Punica granatum*) berasal dari Iran/Afghanistan, bagian dari famili Punicaceae (bersama *P. protopunica*). Kini dibudidayakan luas di berbagai wilayah, pohon berumur panjang ini bisa mencapai 12-16 kaki dan hidup lebih dari 200 tahun.³⁴ Inilah taksonomi ilmiah pohon delima:

Kingdom	: <i>Plantae</i> ,
Filum	: <i>Tracheophyta</i> ,
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> ,
Ordo	: <i>Myrtales</i> ,
Family	: <i>Lythraceae</i> ,
Genus	: <i>Punica</i> ,

Spesies : *Punica granatum*.³⁴

Mirip buah beri, delima berukuran antara 5 hingga 12 cm secara diameter. Warna buahnya bermacam-macam, yang pertama kali terlihat dari warna bunganya. Bercak kulit yang menonjol yang warnanya lebih gelap dari warna dasar buah menutupi kulit. Buah delima punya daging yang berair dengan perpaduan rasa asam dan manis. Bijinya yang berwarna putih terbungkus rapi oleh daging buah, dan uniknya, biji-biji kecil ini hadir dalam berbagai bentuk seperti bulat, lonjong, atau pipih, dengan permukaan yang kasar dan tidak rata.³⁵ Sebagai perdu setinggi 1,5 hingga 5 meter, delima punya daun mengkilap yang kadang tak simetris dan cabang berduri. Daunnya gugur di daerah beriklim sedang, namun tetap hijau di area yang lebih dingin.³⁶ Warna buah delima didominasi merah, namun ada variasi dari ungu tua pada spesies tertentu hingga merah muda kekuningan.³⁷ Delima mudah beradaptasi dengan kondisi kering dan berbagai jenis tanah/cuaca, dengan varietas yang cocok untuk dataran rendah atau tinggi. Namun, sangat sensitif terhadap dingin; suhu di bawah 12° C merusaknya, sehingga delima membutuhkan musim panas yang panjang untuk matang.³⁷

Delima diketahui memiliki sifat antivirus (melawan virus herpes dan influenza) serta banyak digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai agen astringen, hemostatik, dan antimikroba. Kulitnya efektif untuk periodontitis dan cacingan, sementara bijinya digunakan untuk masalah urin, bronkitis, diare, pencernaan, luka terinfeksi, dan diabetes. Ekstrak kulitnya juga menyembuhkan asma dan disentri kronis.³⁵



2.3.1 Kandungan dan manfaat kulit delima

Kulit buah delima memiliki berbagai bentuk tanin, yaitu fenolik yang larut dalam air dan dapat terhidrolisis. Berdasarkan strukturnya, tanin mempunyai empat kategori utama: gallotanin, ellagitannin, tanin kompleks, dan tanin padat. Punicalagin adalah ellagitannin yang merupakan komponen utama pada kulit buah delima, kandungannya jauh lebih tinggi dibandingkan senyawa lainnya. Kulit delima mengandung komponen spesifik khususnya polifenol dan antosianin yang mempunyai efek antioksidan, antiinflamasi, penyembuhan luka, pemutih, antijerawat, anti rambut rontok, antivirus, dan antibakteri. Ini juga mencegah photoaging kulit akibat UVB.³⁸

Delima dikenal luas karena sifat astringen dan anti-inflamasinya, digunakan untuk mengatasi pendarahan, infeksi, diare, dan masalah gigi. Air rebusan buahnya efektif untuk sariawan. Kulit delima sangat berharga dalam pengobatan tradisional (terutama Tiongkok) karena kemampuannya menghentikan pendarahan, membunuh parasit, mengatur keasaman lambung, menyembuhkan luka, serta mengatasi diabetes, kanker, dan tekanan darah. Selain itu, kulit delima juga menghambat racun dan pertumbuhan bakteri.³⁵

Delima, baik buah maupun pohonnya, kaya akan komponen bioaktif

seperti karbohidrat (glukosa, fruktosa, dll.), vitamin (beta-karoten, C, B1, B2), flavonoid, antosianin, dan asam organik (fumarat, sitrat, dll.). Khususnya, kulit buahnya melimpah dengan alkaloid dan senyawa fenolik seperti asam ellagic, punicalagin, quercetin, dan catechin.³⁷

Delima kaya akan flavonoid seperti luteolin, kaempferol, dan glikosida naringenin. Warna buah ini berasal dari antosianin, senyawa yang memberi warna merah, jingga, ungu, dan biru. Enam jenis antosianin utama dalam buah delima telah diidentifikasi, termasuk delphinidin dan pelargonidin dalam bentuk glikosida.³⁷ Asam askorbat dan senyawa fenolik adalah penentu utama tingkat aktivitas antioksidan pada berbagai jenis tanaman delima.³⁹⁻⁴¹

2.4 Pengaruh pemberian gel ekstrak kulit delima (EKD) terhadap ekspresi

Nrf2 dan kadar SOD pada kulit yang dipapar sinar UVB

Paparan UVB memicu ROS di kulit, menyebabkan stres oksidatif, inflamasi, kerusakan DNA, apoptosis, kerusakan sel, dan merangsang melanogenesis.⁴² Peristiwa ini menyebabkan peningkatan gangguan kulit, perubahan struktural dan seluler di berbagai lapisan kulit. UVB merangsang kerusakan oksidatif pada biomolekul melalui pembentukan senyawa yang tidak stabil dan sangat reaktif. Sebagai respons terhadap kerusakan oksidatif, salah satunya adalah jalur Nrf2. Faktor transkripsi ini mentranslokasi ke nukleus dan mendorong ekspresi berbagai gen, di antaranya berbagai enzim detoksifikasi dan antioksidan.²²

Sinar UVB bisa mengubah keseimbangan sistem imun kulit dengan mengganggu produksi sitokin, menghambat pembersihan sel oleh fagosit, meningkatkan radikal bebas dari keratinosit, mengurangi kerja sel Langerhans, dan

menguras jumlah sel T, yang semuanya membuat imunitas sel jadi melemah.⁴²

SOD banyak diekspresikan dalam sitoplasma, berperan penting dalam melindungi sel dari stres oksidatif.²⁹ Kulit manusia memiliki pertahanan antioksidan ganda melawan ROS, terdiri dari mekanisme enzimatik dan non-enzimatik. SOD menghasilkan H₂O₂ yang kurang reaktif, lalu katalase dan glutathione peroksidase memecahnya menjadi air dan oksigen, menstabilkan radikal bebas.²⁷

ROS yang dihasilkan dari rantai transpor elektron berperan penting dalam berbagai proses seluler, termasuk apoptosis dan aktivasi faktor transkripsi. Namun, interaksinya dengan biomolekul seperti lipid dan DNA dapat menyebabkan stres oksidatif. Peroksidasi lipid akibat ROS merusak membran sel dan mengganggu potensial serta tekanan osmotik, yang berujung pada kematian sel.⁴³

Paparan UVB juga menghambat aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, sehingga menurunkan kemampuan kulit untuk menetralkan ROS. Nrf2 bertanggung jawab untuk menginduksi ekspresi gen-gen antioksidan, termasuk SOD, saat terjadi stres oksidatif (akibat paparan UVB), Nrf2 dilepaskan dari Keap1, bermigrasi ke inti sel, dan mengaktifkan ekspresi gen antioksidan seperti SOD, glutathione peroxidase (GPx), dan catalase.

Kulit delima memiliki berbagai bentuk tanin, yaitu fenolik yang larut dalam air dan dapat terhidrolisis. Kulit delima mengandung komponen spesifik khususnya polifenol dan antosianin yang mempunyai efek antioksidan, antiinflamasi, penyembuhan luka, pemutih, antijerawat, dan mencegah photoaging kulit akibat UVB.³⁸ Polifenol seperti ellagic acid, punicalagin, dan flavonoid, yang memiliki

sifat antioksidan kuat, bekerja dengan menangkap langsung ROS, sehingga mengurangi stres oksidatif, memodulasi Keap1 melalui reaksi dengan residu cysteine, sehingga melepaskan Nrf2. Nrf2 kemudian masuk ke inti sel, menginduksi ekspresi gen antioksidan seperti SOD. Ketika ekstrak kulit delima mengaktifkan Nrf2, tubuh meningkatkan produksi enzim SOD secara genetik. SOD lalu mengubah anion superoksida berbahaya menjadi hidrogen peroksida dan oksigen yang lebih aman, mencegah penumpukan ROS dan kerusakan sel lebih lanjut. Ekstrak kulit delima meningkatkan pelepasan dan translokasi Nrf2 ke inti sel, Nrf2 menginduksi ekspresi SOD sebagai enzim utama antioksidan. Polifenol dalam ekstrak langsung menetralkan ROS, mengurangi kerusakan oksidatif pada kulit.

Antioksidan membantu melawan stres oksidatif dengan mengikat dan menetralkan radikal bebas. Kandungan dalam ekstrak bekerja dengan mendonasikan elektron, menstabilkan radikal bebas agar tidak merusak sel.⁴⁴ Penurunan aktivitas SOD terlihat pada lesi kulit yang terpapar.⁴⁵ Diharapkan, gel ekstrak kulit delima dapat meningkatkan ekspresi Nrf2 dan aktivitas antioksidan dengan menaikkan kadar SOD.

BAB III

Kerangka teori, Kerangka konsep, dan Hipotesis

3.1 Kerangka teori

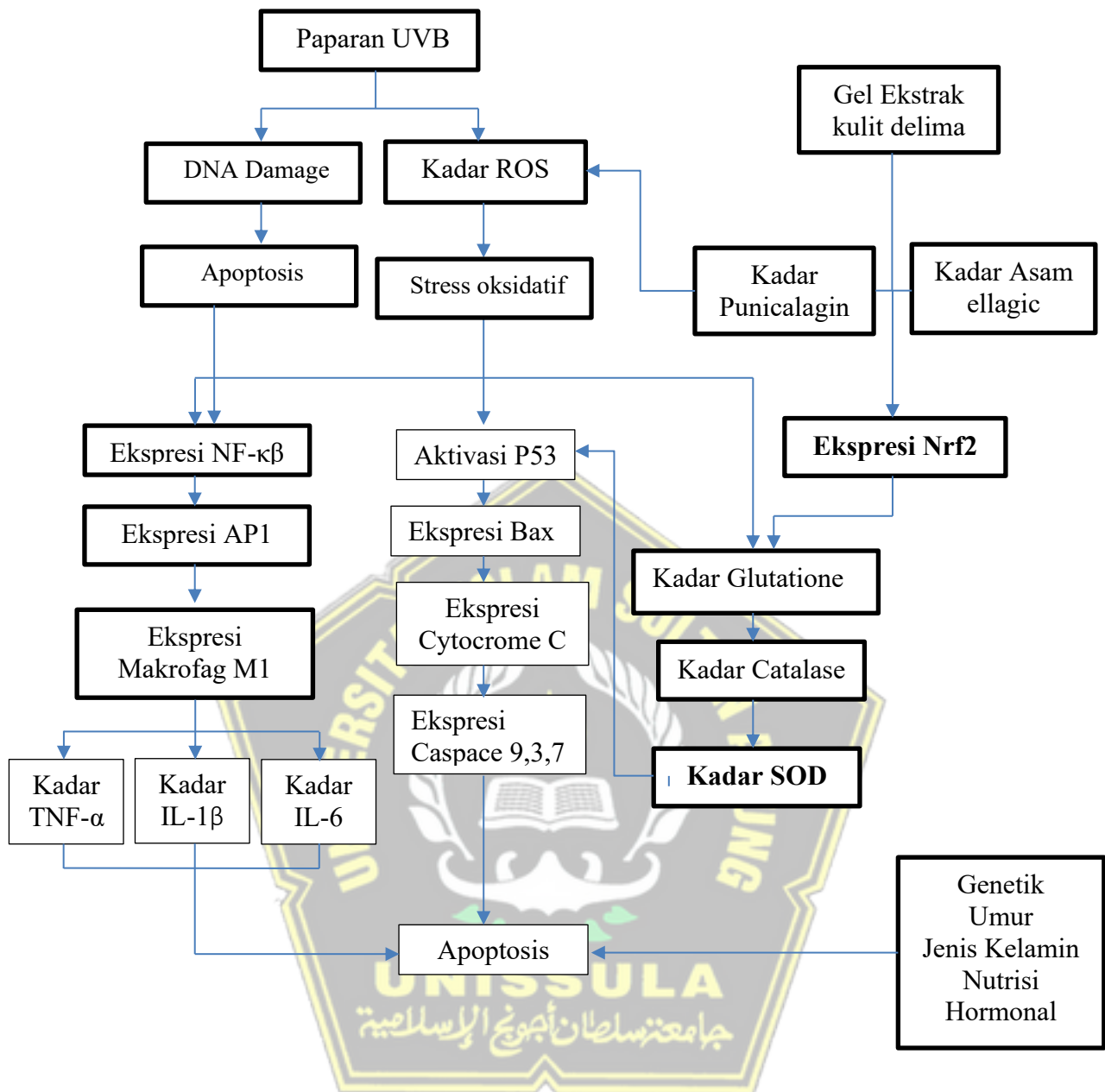
Paparan UV B menyebabkan peningkatan kadar ROS, dan terjadinya inflamasi, serta aktivasi sitokin, kemokin, yang menyebabkan penuaan kulit. Berlebihan di bawah sinar UV? Hati-hati, karena ini bisa merusak pelindung kulit, mengurangi kolagen dan elastin, dan akhirnya mempercepat penuaan dini.⁴⁶ Peradangan mengaktifkan sitokin pro-inflamasi (α) di kulit, yang berakibat pada pengaktifan MMPs dan enzim lain penyebab kerusakan kulit.⁴⁷ Peningkatan ROS di kulit memicu inflamasi (mengaktifkan sitokin, NF- κ B, AP-1), yang berujung pada degradasi kolagen berlebih. Ini menyebabkan kerusakan kolagen, solar elastosis, kerutan, telangiektasis, dan pigmentasi kulit.⁴⁸ Aktivasi sitokin pro-inflamasi juga memicu HIF-1 α , Nrf-2, dan AP-1.⁴⁹

Saat jumlah ROS meningkat karena faktor dalam tubuh atau dari luar, tubuh merespons dengan mengaktifkan NF- κ B dan AP-1. ROS juga melepaskan Nrf2 dari sitoplasma agar bisa masuk ke dalam inti sel dan menghidupkan gen antioksidan. Selain itu, ROS mendorong produksi α -MSH yang ikut mengaktifkan gen pelindung melalui jalur Nrf2. Proses ini terjadi di berbagai sel kulit, termasuk melanosit, keratinosit, dan fibroblas.^{30,31} Superoksida dismutase ekstraseluler (SOD), salah satu enzim antioksidan terpenting dalam menurunkan kadar ROS dan menekan sintesis melanin akibat radiasi sinar matahari.⁵⁰

Kerusakan DNA akibat UVB mengaktifkan jalur sinyal untuk

menentukan apakah masih dapat diperbaiki atau harus mengalami apoptosis. Protein p53 berperan dalam menghentikan siklus sel dan memicu apoptosis jika perbaikan tidak memungkinkan. Jalur MAPK seperti JNK, ERK, dan p38 diaktifkan saat tubuh mengalami stres oksidatif dan berperan dalam kematian sel. UVB juga menyebabkan tubuh melepaskan zat peradangan kayak TNF- α , IL-6, dan IL-1 β , yang memperburuk peradangan dan memicu sel mati. Jika sel mengalami apoptosis, jalur intrinsik mitokondria akan diaktifkan, di mana p53 meningkatkan ekspresi Bax, menyebabkan pelepasan Cytochrome c, yang memicu aktivasi Caspase-9, Caspase-3, dan Caspase-7 hingga terjadi kematian sel. Peran SOD sangat krusial dalam mengurangi produksi ROS dan mencegah apoptosis; jika aktivitas SOD rendah, akumulasi radikal superoksida akan mempercepat stres oksidatif, aktivasi p53, dan kematian sel.

SOD banyak digunakan dalam kosmetik sebagai bahan anti-penuaan dan antioksidan. Ini efektif mengurangi kerusakan kulit akibat radikal bebas, membantu mencegah kerutan, garis halus, dan bintik penuaan. Selain itu, SOD juga melembutkan kulit, melindungi dari sinar UV, dan mengurangi tanda-tanda penuaan lainnya.⁵¹ Berdasarkan teori tersebut, maka di buat kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori

3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.2 Skema Kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

Gel EKD diketahui memengaruhi ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar yang terpapar UV-B akut.

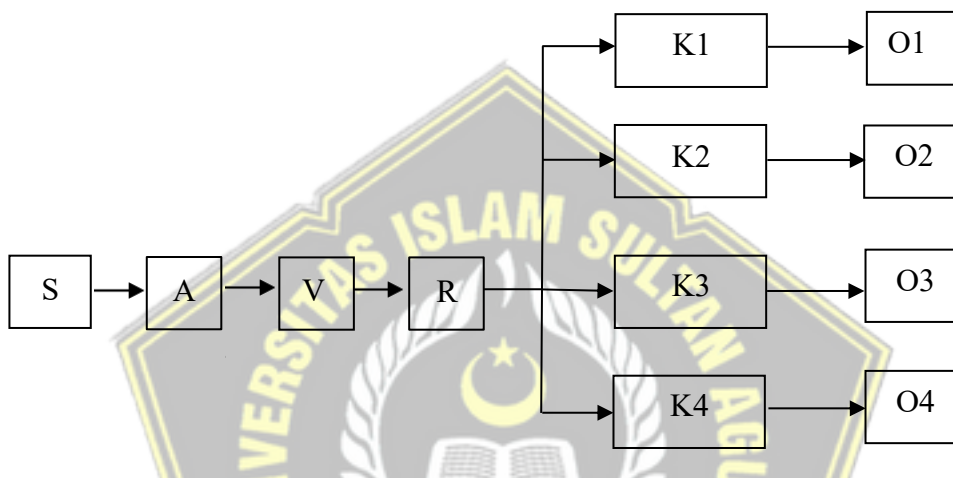


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Kami melakukan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group*, mengikuti skema yang disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Skema Rancangan penelitian

Keterangan :

S: Subjek Penelitian tikus

A: Adaptasi

V: Validasi

R: Randomisasi

Perlakuan K1 : Kontrol sehat (Tikus sehat)

Perlakuan K2 : Kontrol positif (Tikus dipapar sinar UVB dan diberikan basis gel selama 7 hari)

Perlakuan K3 : Tikus dipapar sinar UVB dan diberikan gel EKD 10% selama 7 hari

Perlakuan K4 : Tikus dipapar sinar UVB dan diberikan gel EKD 20% selama 7 hari

O : Observasi atau pengamatan

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Sampel penelitian adalah tikus Wistar dengan kriteria tertentu:

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus Wistar jantan
- b. Kelompok perlakuan dipapar sinar UVB pada jaringan kulit
- c. Tikus berumur 3-4 bulan
- d. Tikus dengan Kondisi sehat
- e. Berat badan tikus berkisar 200-250 gram

2. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati / infeksi di penelitian.

4.2.2. Jumlah Sampel

Total sampel ditentukan menggunakan rumus Federer:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

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

$$n \geq 6$$

Keterangan: t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan.

Hasil perhitungan diperoleh jumlah sampel sebanyak 6 ekor tikus tiap kelompok. jumlah sampel yang diperlukan adalah 24 ekor tikus. Agar tidak terjadi *drop out* sampel, setiap kelompok ditambah satu tikus cadangan, sehingga keseluruhan sampel berjumlah 28 ekor tikus.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

a. Variabel Bebas

Gel EKD dengan dosis di 10% dan 20%

b. Variabel perantara

Ekspresi Nrf2

c. Variabel terikat

Kadar SOD

d. Variabel Prakondisi

Tikus Wistar dengan paparan UVB.

4.3.2. Definisi Operasional

a. Gel ekstrak kulit delima

Ekstrak kulit delima (EKD) dari Semarang dibuat maserasi dengan etanol 70%, lalu diformulasikan menjadi gel 10% dan 20%. Gel yang menggunakan basis dari propilen glikol, PVA, HPMC, dll., ini diaplikasikan topikal 0,5g/hari di punggung selama 7 hari paparan UVB. Satuan ukur mg dengan skala ordinal

b. Ekspresi Nrf2

Ekspresi Nrf2 pada jaringan kulit tikus diukur setelah 7 hari perlakuan topikal dan paparan UVB. Pengukuran dilakukan melalui ekstraksi RNA dan analisis qRT-PCR, dengan hasil dalam satuan *fold change* Nrf2 mRNA, menggunakan skala ukur rasio

c. Kadar SOD

Kadar SOD diukur pada jaringan kulit tikus setelah 7 hari terpapar UVB dan menerima intervensi topikal. Sampel kulit diambil pada hari

ke-8, lalu kadar SOD dianalisis menggunakan metode ELISA yang disesuaikan untuk sampel jaringan kulit lokal. Hasil pengukuran dengan satuan (pg/mL), menggunakan skala rasio

4.4 Bahan atau Materi Penelitian

Bahan penelitian terbagi tiga: pembuatan ekstrak (kulit qdelima, etanol 70%), perlakuan (mencit, pakan, air minum), dan pemeriksaan (berbagai *diluent*, *antibodi*, *buffer*, dan larutan kimia lainnya).

4.5 Peralatan

Peralatan penelitian ini mencakup: alat pembuatan ekstrak (*rotary evaporator*, *soxhlet*, oven, dll.); alat perlakuan pada mencit (kandang, papan fiksasi, alat bedah, alat *UV light* Philips 302 nm); serta alat persiapan dan pemeriksaan sampel (*scalpel*, PBS, sentrifus, *microplate*, *ELISA reader*, dll.).

4.6 Cara Penelitian dan Alur kerja

4.6.1 *Ethical Clearance*

Penelitian ini memerlukan *ethical clearance* yang akan diajukan ke Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang sebelum pelaksanaannya.

4.6.2 Cara Pembuatan Ekstrak kulit delima

Sampel kulit delima sebanyak 2 kg, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Hasilnya dilakukan pemeriksaan kadar air dengan *moisture balance*, jika hasil kadar air dibawah 10% maka hasil pengeringan dianggap baik. Simplisia kulit delima diproses menjadi

serbuk, kemudian 500 gram diekstraksi tiga kali dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Setelah perendaman dan penyaringan, seluruh filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk menghasilkan ekstrak kental.

4.6.3 Pembuatan sediaan gel ekstrak kulit delima

Pembuatan gel ekstrak kulit delima melibatkan penimbangan bahan, peleburan PVA, pengembangan HPMC dalam aquades dingin, pelarutan metilparaben dan propilparaben dalam propilen glikol, pencampuran semua bahan secara berurutan, dan penambahan ekstrak yang telah dilarutkan dengan aquades, semuanya diaduk hingga homogen.⁵²

4.6.4 Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar (usia 3-4 bulan, berat 200-250 gram). Tikus diadaptasikan seminggu di ruangan berventilasi (suhu 28-32°C), diberi pakan pelet dan air minum. 28 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok (kontrol sehat, plasebo, gel EKD 10%, gel EKD 20%) dan ditempatkan di kandang masing-masing (6+1 tikus per kandang).

4.6.5 Paparan UV B

1. Tikus yang telah diadaptasi selama 7 hari.
2. Bulu di area punggung tikus dicukur bersih dengan diameter 2×2 cm.
3. Punggung tikus dipapar UV-B (302nm, 160mJ/cm²/hari) selama 7 hari, dengan jarak 12cm dan durasi 12menit per hari.

4. Kelompok K3 dan K4 diberi gel ekstrak kulit delima (10% dan 20%) secara topikal sekali sehari selama 7 hari, satu jam setelah paparan UVB.

4.6.6 Pengambilan Sampel Jaringan

Setelah pemberian perlakuan, hari ke 8 dilakukan pengambilan jaringan. Tikus dibius lalu diterminasi. Kulit yang terpapar UVB disayat, sampel jaringan dipotong, ditimbang, dan dibagi untuk analisis ELISA serta ekstraksi RNA/sintesis cDNA untuk qRT-PCR.

4.6.7 Validasi paparan UVB dengan pewarnaan *Masson's Trichrome*

Kepadatan kolagen pada kulit tikus yang terpapar UVB dinilai menggunakan pewarnaan Masson's Trichrome dengan prosedur sebagai berikut:

1. Parafin dihilangkan dari preparat dengan perendaman berurutan (sekitar 2 menit per larutan) dalam Xylene, alkohol (absolut, 96%, 80%, 70%), dan Aquabides, sebelum ditempatkan di *chamber* kelembapan.
2. Prosedur berlanjut dengan menambahkan reagen A dan reagen B ke preparat sesuai takaran, lalu menutup *chamber* kelembapan. Setelah didiamkan 10 menit, cairan dibuang tanpa pembilasan, dan preparat dikeringkan cepat selama 5 detik.
3. Tambahkan Reagen C selama 4 menit.
4. Bilas dengan Aquabides (3–4 detik), lalu tambahkan Reagen D selama 4 menit.

5. Bilas lagi dengan Aquabides (3–4 detik). Tambahkan Reagen E selama 10 menit, buang cairan tanpa bilas, dan keringkan 5 detik.
6. Tambahkan Reagen F selama 5 menit, lalu bersihkan dengan Aquabides.
7. Lakukan dehidrasi bertahap dengan Alkohol 70%, 80%, 96% (masing-masing 5–10 detik).
8. Lanjutkan dehidrasi dengan Alkohol absolut dan Xylene (masing-masing 1 menit).
9. Lakukan proses *mounting*; kolagen akan terwarnai biru.
10. Kepadatan kolagen dianalisis dengan *ImageJ software* melalui perbandingan densitas rasio dekonvolusi warna kolagen, memisahkannya dari latar belakang jaringan. Pengamatan adalah rerata area jaringan ikat biru dari 5 lapang pandang mikroskop cahaya (400x).⁵³

4.6.8 Prosedur preparasi jaringan kulit untuk analisis ekspresi Nrf2 dengan metode qRT-PCR

Setiap tahap harus dilakukan dengan hati-hati guna mencegah degradasi RNA dan memastikan kualitas data yang optimal. Tahap awal penelitian meliputi pengambilan jaringan kulit secara steril, pencucian dengan PBS (pH 7.4), pembekuan dalam nitrogen cair, dan penyimpanan pada suhu -80°C sampai ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA total dilakukan menggunakan TRIzol reagent melalui proses homogenisasi jaringan, pemisahan fase dengan kloroform, serta presipitasi RNA menggunakan isopropanol, diikuti pencucian dengan etanol 75% untuk

memastikan kemurnian RNA sebelum dilarutkan dalam RNase-free water. Untuk memastikan kualitas RNA, dilakukan kuantifikasi dan analisis kemurnian menggunakan NanoDrop Spectrophotometer, serta pengecekan integritas RNA melalui elektroforesis agarose gel 1%, di mana keberadaan pita 18S dan 28S yang jelas menunjukkan RNA berkualitas baik. RNA yang memenuhi standar kemudian digunakan untuk sintesis cDNA, dengan mencampurkan 500–1000 ng RNA total dengan buffer reaksi, dNTPs, random hexamer primers, serta reverse transcriptase enzyme dari kit cDNA synthesis. Sintesis cDNA dilakukan di *thermocycler* (42°C selama 60 menit, inaktivasi enzim 95°C selama 5 menit), lalu disimpan pada –20°C sebelum analisis qRT-PCR.

4.6.9 Prosedur diagnosis ekspresi Nrf2 metode qRT-PCR

Analisis ekspresi Nrf2 dilakukan menggunakan qRT-PCR. Campuran reaksi dibuat dengan cDNA sampel, *master mix*, primer, dan air bebas nuclease. Produk PCR kemudian dianalisis dengan program termal spesifik (predenaturasi 95°C, denaturasi 95°C, *annealing* 55–60°C) selama 40 siklus. Peningkatan ekspresi gen dihitung relatif terhadap *housekeeping gen* menggunakan *EcoStudy software*.

4.6.10 Prosedur preparasi jaringan kulit untuk pengukuran kadar SOD metode ELISA

Proses preparasi jaringan kulit untuk analisis kadar SOD menggunakan ELISA memerlukan prosedur yang sistematis guna memastikan ekstraksi protein yang optimal. Tahap pertama adalah

pengambilan dan penyimpanan sampel, di mana jaringan kulit seberat 50-100 mg dipotong menggunakan pisau bedah steril, kemudian dicuci dengan PBS (pH 7.4) untuk menghilangkan kontaminan dan darah. Sampel segera dibekukan (nitrogen cair atau -80°C). Untuk homogenisasi, jaringan dimasukkan ke buffer lisis (mengandung PBS, Triton X-100/Nonidet P-40, dan *protease inhibitor*), dihomogenisasi, dan disentrifugasi pada 10.000–15.000rpm (15–20 menit, 4°C). Supernatan yang mengandung SOD dipisahkan untuk analisis.

Tahap berikutnya adalah kuantifikasi protein, yang dilakukan dengan metode Bradford assay atau BCA (Bicinchoninic Acid Assay) untuk memastikan konsentrasi protein sesuai dengan kebutuhan ELISA. Setelah itu, dilakukan analisis ELISA untuk SOD, menggunakan kit ELISA spesifik sesuai protokol pabrikan. Langkah ini meliputi penyiapan plate ELISA, di mana standar SOD dan sampel supernatan jaringan dimasukkan ke dalam well ELISA yang telah dilapisi antibodi anti-SOD, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30–60 menit. Setelah inkubasi, dilakukan pencucian dan deteksi, dengan mencuci well menggunakan buffer pencuci, menambahkan antibodi deteksi spesifik untuk SOD, serta substrat enzim seperti TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) yang akan menghasilkan perubahan warna. Terakhir, reaksi dihentikan dengan *stop buffer* dan absorbansi sampel diukur pada 450nm menggunakan *microplate reader*. Kadar SOD dalam jaringan kemudian dihitung berdasarkan kurva standar dari kit ELISA,

sehingga diperoleh hasil kuantitatif yang dapat dianalisis lebih lanjut.

4.6.11 Prodesur pengukuran kadar SOD metode ELISA

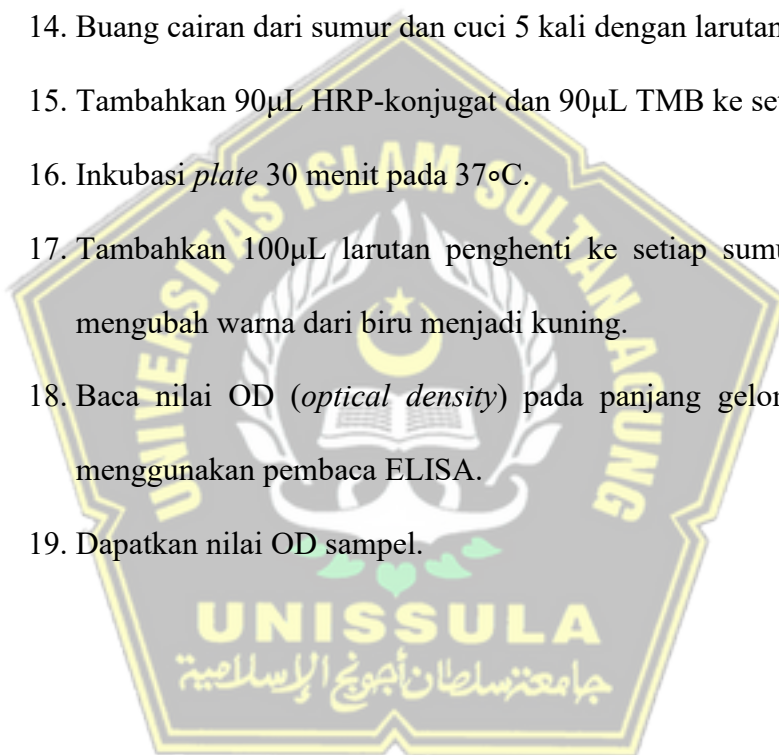
Untuk pemeriksaan ELISA, jaringan ditambahkan PBS (pH 7.4), dihomogenisasi dingin, disentrifugasi (2000–3000rpm, 20 menit), dan supernatan diambil sebagai sampel uji. Sampel dapat disimpan pada suhu -20°C . Kadar SOD pada sampel jaringan kulit dianalisis dengan ELISA menggunakan *microplate reader* (450nm), mengikuti prosedur produk. Tahapan ELISA adalah:

1. Pembuatan standard

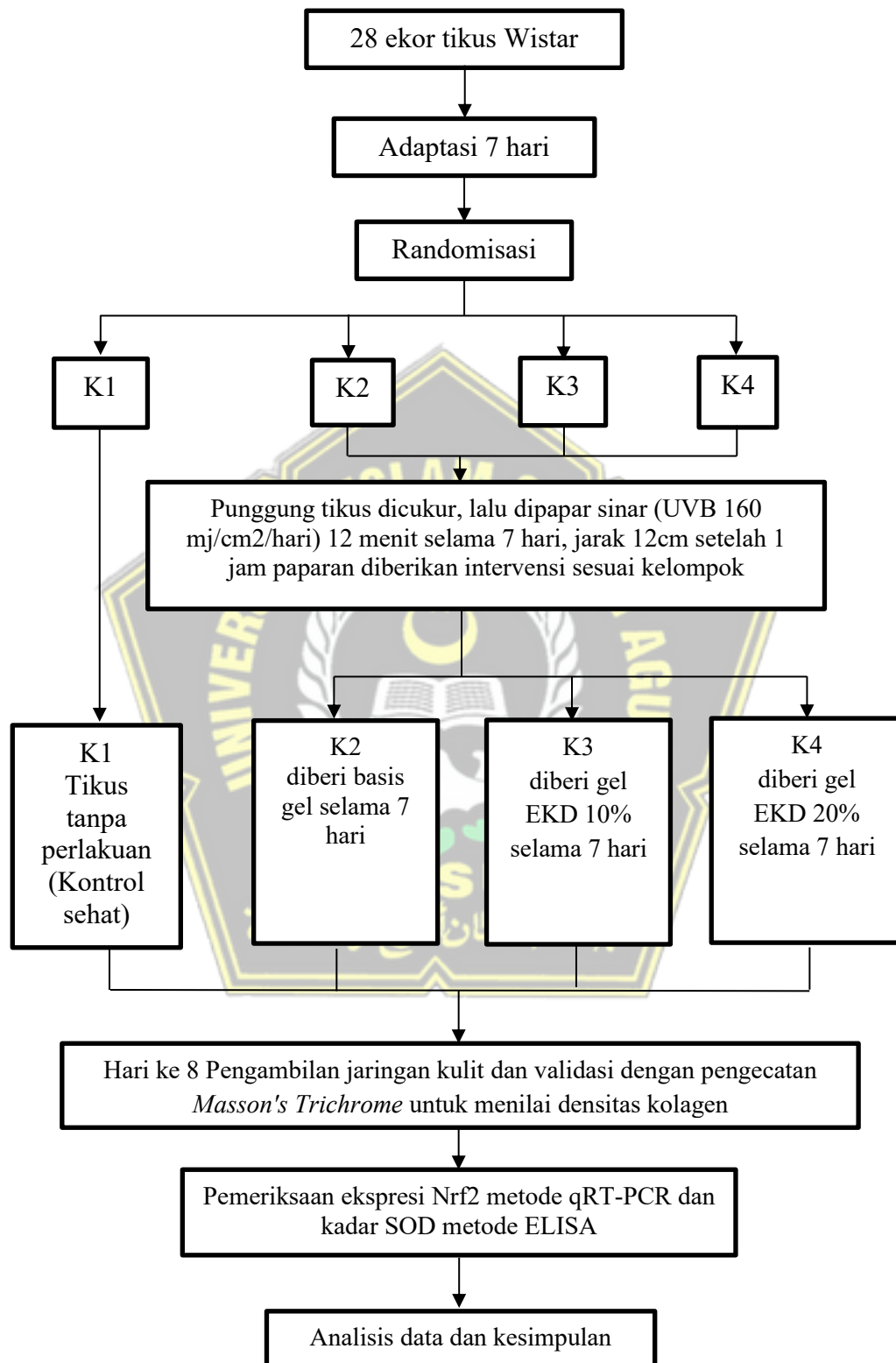
Siapkan sepuluh sumur *microplate* untuk standar. Pada sumur 1 dan 2, campurkan $100\mu\text{L}$ standar dengan $50\mu\text{L}$ *standard diluent*. Lanjutkan pengenceran seri dengan mengambil $100\mu\text{L}$ cairan dari dua sumur sebelumnya, campur dengan $50\mu\text{L}$ *standard diluent*, untuk setiap pasang sumur berikutnya (3-4, 5-6, 7-8, 9-10).

2. Tambahkan Antibodi Penangkap ke setiap sumur, lalu inkubasi 30 menit pada 37°C atau semalaman pada 4°C .
3. Siapkan larutan pencuci dengan melarutkan 1ml *wash solution* 30x dalam 29ml aquades.
4. Buang cairan dari sumur dan cuci 5 kali dengan larutan pencuci.
5. Tambahkan *blocking buffer* untuk menempelkan antigen pada *plate*.
6. Inkubasi *plate* 60 menit pada 37°C atau semalaman pada 4°C .
7. Masukkan $10\mu\text{L}$ sampel dan $40\mu\text{L}$ *sampel diluent* ke setiap sumur (langsung ke dasar), lalu campur.

8. Inkubasi *plate* 120 menit pada suhu ruangan.
9. Tambahkan 100 μ L antibodi biotinilasi ke setiap sumur.
10. Inkubasi *plate* 60 menit pada 37°C atau semalaman pada 4°C.
11. Buang cairan dari sumur dan cuci 5 kali dengan larutan pencuci.
12. Tambahkan 100 μ L larutan ABC ke setiap sumur.
13. Inkubasi 30 menit pada 37°C.
14. Buang cairan dari sumur dan cuci 5 kali dengan larutan pencuci.
15. Tambahkan 90 μ L HRP-konjugat dan 90 μ L TMB ke setiap sumur.
16. Inkubasi *plate* 30 menit pada 37°C.
17. Tambahkan 100 μ L larutan penghenti ke setiap sumur, yang akan mengubah warna dari biru menjadi kuning.
18. Baca nilai OD (*optical density*) pada panjang gelombang 450nm menggunakan pembaca ELISA.
19. Dapatkan nilai OD sampel.



4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

4.8 Metode Analisis Data

Data penelitian diuji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Levene test*). Ekspresi Nrf2 yang normal dan homogen dianalisis dengan *One-Way Anova* dan *Post Hoc LSD*. Sementara itu, kadar SOD yang normal tetapi tidak homogen dianalisis menggunakan *One-Way Anova* dan *Post Hoc Tamhane*. Analisis data dilakukan menggunakan SPSS, dengan keputusan menolak atau menerima hipotesis didasarkan pada tingkat signifikansi (α) 5%.

4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

Kami melakukan penelitian ini di SCCR selama Oktober-November 2024.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan menguji efek gel ekstrak kulit delima (EKD) terhadap ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada 28 tikus Wistar jantan. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok: K1 (kontrol sehat), K2 (UVB + basis gel), K3 (UVB + gel EKD 10%), dan K4 (UVB + gel EKD 20%), lalu dipapar UVB (302nm, 160mJ/cm²/hari) selama 7 hari. Pada hari ke-8, sampel kulit diambil untuk analisis Nrf2 via qRT-PCR, SOD via ELISA, dan kepadatan kolagen via pewarnaan *Masson's Trichrome* (satu tikus per kelompok).

5.1.1 Hasil analisis ekspresi Nrf2 jaringan kulit tikus yang dipapar sinar UVB akut

Tabel 5.1 menyajikan hasil uji dan rata-rata analisis ekspresi **Nrf2** dari setiap kelompok penelitian.

Tabel 5.1 Hasil penelitian ekspresi Nrf2 jaringan kulit

Variabel	Kelompok			<i>p</i>
	K2	K3	K4	
	Basis gel	Gel EKD 10%	Gel EKD 20%	
	Rerata ± SD n = 6	Rerata ± SD n = 6	Rerata ± SD n = 6	
Ekspresi Nrf2 (Nrf2 mRNA <i>relative expression</i>)	2,30±0,39	1,19±0,15	4,15±0,55	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,203*	0,284*	0,647*	
<i>Levene's Test</i>				0,098
<i>One way anova</i>				0,000*

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
 * *Leuvene Test* = Homogen ($p > 0,05$)
 * *One way anova* = Signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil rata-rata (tabel 5.1) ekspresi Nrf2 paling tinggi di kelompok K4 dengan pemberian gel EKD 20% sebesar $4,15 \pm 0,55$, pada kelompok K2 dengan pemberian basis gel lebih rendah sebesar $2,30 \pm 0,39$, dan ekspresi Nrf2 paling rendah pada kelompok K3 dengan pemberian gel EKD 10% sebesar $1,19 \pm 0,15$.

Data ekspresi Nrf2 dianalisis normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitasnya dengan uji *Levene's test*. Hasilnya menunjukkan distribusi data normal ($p > 0,05$ pada semua kelompok) dan homogen ($p = 0,098$), sehingga analisis statistik dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way Anova*.

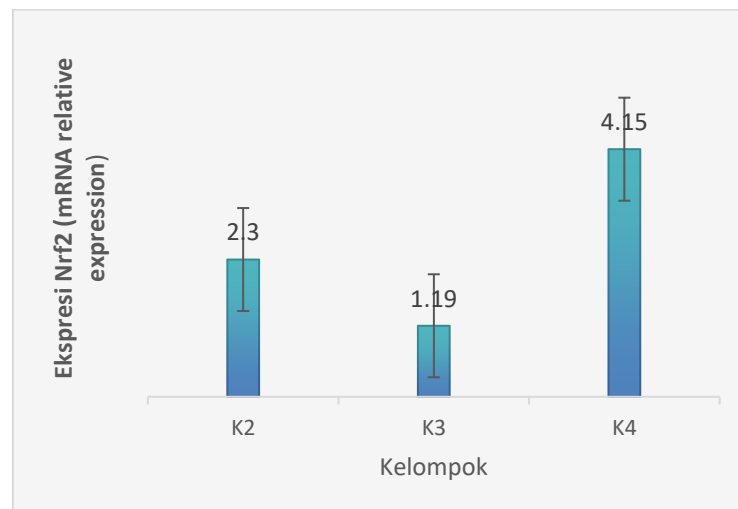
Hasil dari uji *One way anova* didapatkan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi Nrf2 pada semua kelompok. Hasil uji *One way anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post hoc LSD* untuk mengetahui pasangan kelompok yang berbeda, seperti pada (tabel 5.2):

Tabel 5.2 Hasil uji *Post hoc LSD* ekspresi Nrf2 antar kelompok penelitian

Kelompok perbandingan	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Basis gel (K2)	Gel EKD 10% (K3)	0,000*
	Gel EKD 20% (K4)	0,000*
Gel EKD 10% (K3)	Gel EKD 20% (K4)	0,000*

Keterangan: *Bermakna $p < 0,05$

Uji *Post Hoc LSD* pada ekspresi Nrf2 menunjukkan perbedaan signifikan antarkelompok. Gel EKD 20% (kelompok K4) memberikan peningkatan ekspresi Nrf2 paling signifikan dibanding K3 dan K2, seperti tertera di Grafik 5.1.



Gambar 5. 1 Grafik rerata dan *Post hoc* LSD Nrf2 ($*=p<0,05$)

Pemberian gel EKD 20% saat diaplikasikan meningkatkan ekspresi Nrf2, senyawa bioaktif dalam gel menembus lapisan kulit atau mukosa melalui difusi. Selanjutnya, senyawa aktif seperti punicalagin dan asam ellagic mengintervensi interaksi Nrf2-Keap1 dengan mengoksidasi residu sistein Keap1 dan menghambat degradasi Nrf2, sehingga meningkatkan stabilitasnya di dalam sel.

5.1.2 Hasil analisis kadar SOD jaringan kulit tikus yang dipapar sinar UVB akut

Tabel 5.2 menampilkan hasil uji dan rata-rata analisis kadar SOD dari setiap kelompok penelitian.

Tabel 5.3 Hasil penelitian kadar SOD

Variabel	Kelompok				p
	K1	K2	K3	K4	
	Tikus Sehat	Basis gel	Gel EKD 10%	Gel EKD 20%	
	Rerata $\pm$ SD n = 6	Rerata $\pm$ SD n = 6	Rerata $\pm$ SD n = 6	Rerata $\pm$ SD n = 6	
Kadar SOD (pg/mL)	139,65 $\pm$ 39,96	71,00 $\pm$ 21,05	759,43 $\pm$ 139,97	1346,59 $\pm$ 132,23	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,335	0,670	0,498	0,754	
<i>Levene's Test</i>					0,022
<i>One One Anova</i>					0,000

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal ($p > 0,05$)
 * *Leuvene Test* = Homogen ($p > 0,05$)
 * *One way Anova* = Signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil (tabel 5.3) rata-rata kadar SOD paling tinggi pada kelompok K4 dengan pemberian gel EKD 20% sebesar 1346,59 $\pm$ 132,23, lebih rendah pada kelompok K3 dengan pemberian gel EKD 10% 759,43 $\pm$ 139,97. Kelompok K1 pada tikus sehat sebesar 139,65 $\pm$ 39,96 dan kadar SOD paling rendah pada kelompok K2 dengan pemberian basis gel sebesar 71,00 $\pm$ 21,05.

Meskipun data kadar SOD normal berdasarkan uji Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), uji *Levene's Test* menunjukkan ketidakhomogenan ($p = 0,022$). Karenanya, data dianalisis menggunakan uji parametrik *One-Way Anova* dan uji *Post Hoc Tamhane*.

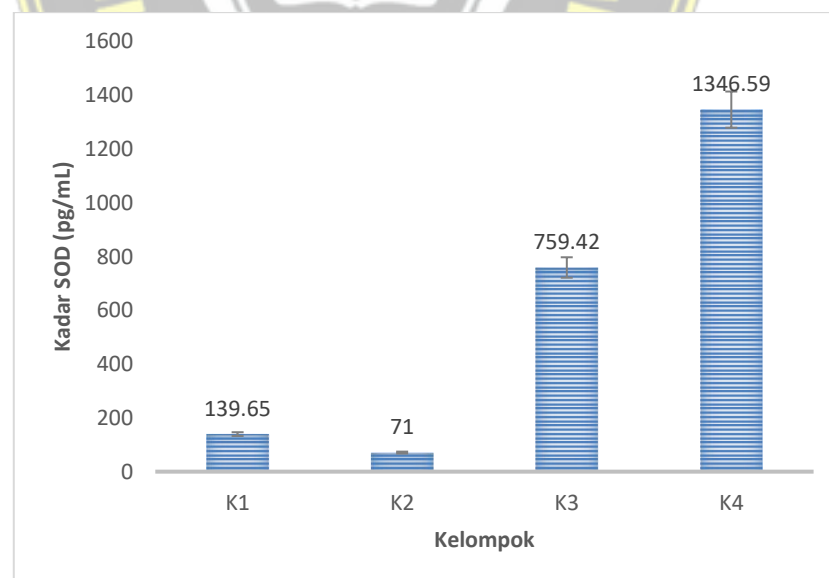
Uji *One-Way Anova* menunjukkan perbedaan kadar SOD yang signifikan ($p = 0,000$) antar kelompok. Untuk mengidentifikasi pasangan kelompok yang berbeda, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Hasil uji *Post hoc Tamhane* Kadar SOD jaringan kulit

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Tikus Sehat (K1)	Basis gel (K2)	0,083
	Gel EKD 10% (K3)	0,002*
	Gel EKD 20% (K4)	0,000*
Basis gel (K2)	Gel EKD 10% (K3)	0,002*
	Gel EKD 20% (K4)	0,000*
Gel EKD 10% (K3)	Gel EKD 20% (K4)	0,001*

Keterangan: *Bermakna $p < 0,05$

Hasil analisis uji *Post hoc tamhane* terhadap kadar SOD didapatkan adanya perbedaan tidak bermakna antar dua kelompok K1 dibandingkan K2, Perbedaan bermakna terjadi pada kelompok K4 dengan K1, K4 dengan K2, dan K4 dengan K3. Sehingga dapat disimpulkan pemberian gel EKD 20% memberikan pengaruh paling signifikan terhadap peningkatan kadar SOD. Seperti tergambar pada grafik 5.2 sebagai berikut:



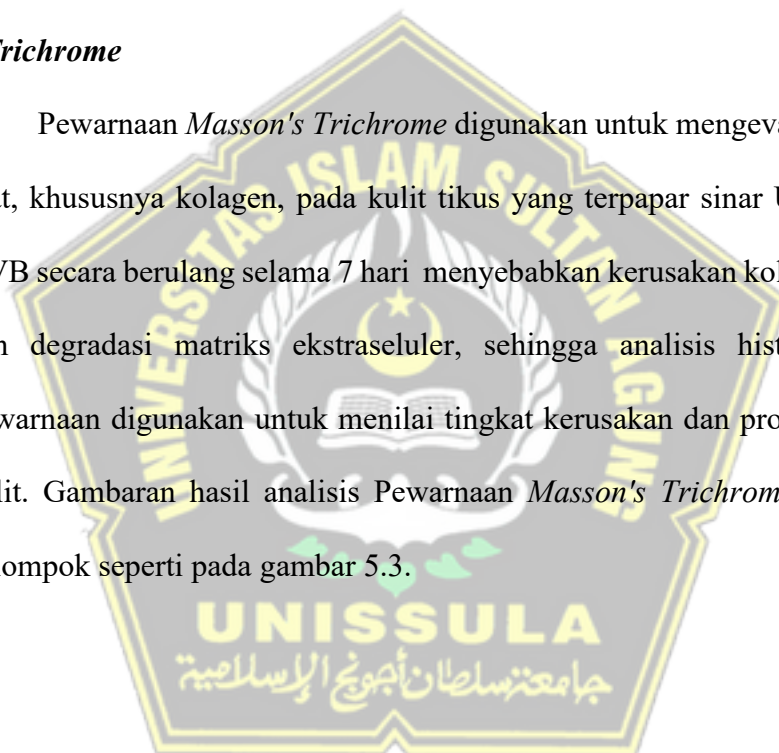
Gambar 5.2 Grafik rerata dan Post hoc tamhane SOD ($*=p < 0,05$)

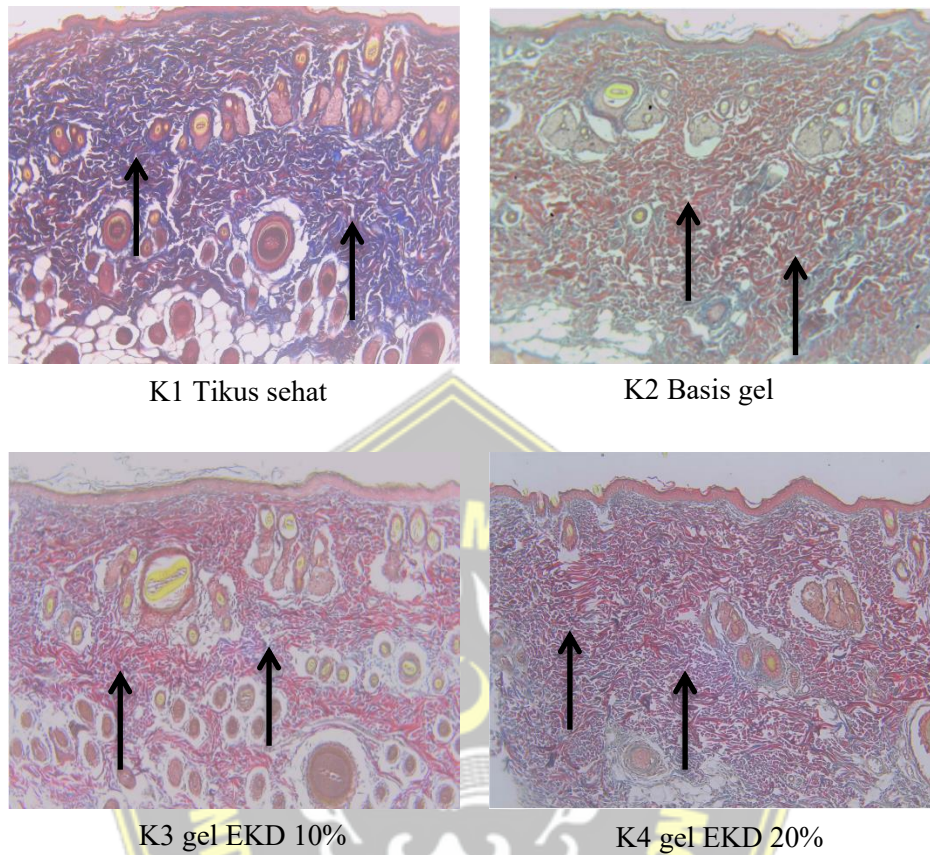
Gel EKD 20% meningkatkan kadar SOD secara signifikan, konsisten dengan efeknya pada Nrf2. SOD diatur oleh Nrf2, yang normalnya inaktif di

sitoplasma karena terikat Keap1. Setelah dilepaskan dari Keap1, Nrf2 berpindah ke nukleus dan berikatan dengan *Antioxidant Response Element* (ARE). Ikatan ini menginduksi ekspresi berbagai gen antioksidan, termasuk SOD1 (sitoplasma) dan SOD2 (mitokondria). Peningkatan ekspresi gen ini menyebabkan produksi enzim SOD yang lebih tinggi.⁵⁴

5.1.3 Hasil validasi histologi jaringan kulit dengan pewarnaan *Masson's Trichrome*

Pewarnaan *Masson's Trichrome* digunakan untuk mengevaluasi jaringan ikat, khususnya kolagen, pada kulit tikus yang terpapar sinar UVB. Paparan UVB secara berulang selama 7 hari menyebabkan kerusakan kolagen, fibrosis, dan degradasi matriks ekstraseluler, sehingga analisis histologi dengan pewarnaan digunakan untuk menilai tingkat kerusakan dan proses regenerasi kulit. Gambaran hasil analisis Pewarnaan *Masson's Trichrome* pada semua kelompok seperti pada gambar 5.3.





Gambar 5.3 Hasil histologi jaringan kulit dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* pada mikroskop perbesaran 400x

Melalui pewarnaan *Masson's Trichrome*, kami dapat mengevaluasi kepadatan dan penyebaran serat kolagen di jaringan kulit tikus. Pewarnaan ini mewarnai kolagen dengan warna biru, sementara sitoplasma dan serat otot tampak merah, serta inti sel tampak hitam atau coklat gelap. Perbandingan antar kelompok menunjukkan efek perlindungan gel ekstrak kulit delima (*Punica granatum*) terhadap kerusakan kolagen akibat paparan sinar UVB. Pada kelompok K1, pewarnaan *Masson's Trichrome* menunjukkan serat kolagen yang padat, teratur, dan tersusun rapi di lapisan dermis. Warna biru intens menunjukkan densitas kolagen

yang tinggi, menandakan jaringan kulit yang sehat. Lapisan epidermis tampak tipis dan tidak menunjukkan tanda-tanda inflamasi atau degradasi kolagen.

Kelompok K2, terjadi penurunan densitas kolagen yang signifikan dibandingkan kelompok K1. Pewarnaan menunjukkan kolagen yang lebih tipis, terfragmentasi, dan tidak teratur, dengan intensitas warna biru yang lebih redup. Paparan UVB menyebabkan degradasi kolagen akibat aktivasi enzim MMPs (matrix metalloproteinases), yang menghancurkan matriks ekstraseluler. Selain itu, terdapat penebalan epidermis (hiperplasia), infiltrasi sel inflamasi, dan tanda-tanda fibrosis awal sebagai respons terhadap kerusakan UVB, pada kelompok K3, pemberian gel ekstrak kulit delima 10% mulai menunjukkan efek protektif terhadap kolagen. Pewarnaan Masson's Trichrome menunjukkan peningkatan densitas serat kolagen dibandingkan K2, meskipun masih lebih rendah dari K1. Warna biru lebih intens dibandingkan K2, tetapi struktur serat kolagen belum sepenuhnya teratur. Hal ini menunjukkan bahwa gel EKD 10% mampu menghambat degradasi kolagen, tetapi perlindungannya belum optimal. Epidermis masih terlihat lebih tebal dibandingkan K1, menandakan proses regenerasi masih berlangsung.

Kelompok K4 menunjukkan hasil terbaik dalam mempertahankan densitas dan struktur kolagen. Pewarnaan *Masson's Trichrome* menunjukkan warna biru yang lebih intens dan distribusi kolagen yang lebih teratur, mendekati kelompok K1. Ini mengindikasikan bahwa gel EKD 20% mampu melindungi dan meningkatkan regenerasi kolagen secara lebih efektif dibandingkan K3. Lapisan epidermis tampak lebih tipis dibandingkan K2 dan K3, menunjukkan penurunan inflamasi dan percepatan regenerasi jaringan. Efek protektif ini diduga berasal dari

senyawa aktif seperti punicalagin dan asam ellagic, yang berperan dalam aktivasi jalur Nrf2 dan inhibisi MMPs, sehingga mengurangi degradasi kolagen akibat UVB.

5.2 Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi Nrf2 pada kelompok K3 lebih rendah dibanding kelompok K2, yang mengindikasikan bahwa konsentrasi EKD 10% belum cukup efektif dalam meningkatkan aktivasi Nrf2 secara signifikan, pada konsentrasi rendah senyawa aktif dalam ekstrak belum mencapai ambang bioaktif yang diperlukan untuk mengganggu ikatan Nrf2–Keap1 secara optimal.⁵⁶ Kelompok K4 menunjukkan aktivasi Nrf2 yang jauh lebih tinggi dibandingkan kelompok K2 dan K3. Pemberian gel EKD pada konsentrasi 20%, secara signifikan meningkatkan aktivasi Nrf2. Senyawa aktif dalam ekstrak kulit delima, seperti flavonoid dan ellagitannin berperan dalam menghambat ikatan antara Nrf2 dan Keap1, sehingga menyebabkan translokasi Nrf2 ke inti sel.⁵⁷ Di dalam nukleus, Nrf2 menginduksi ekspresi gen-gen antioksidan seperti HO-1, SOD, GPx, dan CAT, yang berkontribusi dalam mengurangi stres oksidatif dan inflamasi, serta mendukung regenerasi seluler pada jaringan kulit.⁵⁸ Konsentrasi 20% tampaknya memberikan efek yang paling optimal, kemungkinan karena bioavailabilitas dan penetrasi senyawa aktif yang lebih efisien dibandingkan konsentrasi 10%.

Disimpulkan bahwa perlakuan gel EKD 20% secara signifikan meningkatkan ekspresi Nrf2, dan perbedaan ekspresi antar kelompok bersifat signifikan secara statistik, baik dibanding kelompok yang hanya terpapar UVB yang diberikan basis gel.

Hasil penelitian terhadap kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) antara kelompok K1 dan K2 tidak menunjukkan signifikansi secara statistik. Durasi dan intensitas paparan UVB yang belum cukup untuk menurunkan aktivitas enzim SOD secara bermakna. Paparan UVB memang diketahui meningkatkan produksi ROS yang dapat menekan sistem antioksidan endogen seperti SOD.⁵⁹ Namun, penelitian melaporkan bahwa penurunan signifikan aktivitas enzim antioksidan di kulit umumnya terjadi setelah paparan UVB yang bersifat kronis atau jangka panjang.⁶⁰ Tidak signifikannya kadar SOD antara kelompok K1 dan K2 dapat mencerminkan respons awal tubuh yang masih mampu mengkompensasi stres oksidatif ringan akibat paparan UVB.⁶¹

Peningkatan kadar SOD pada K3 belum setinggi K4 (EKD 20%), hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi 10% sudah memberikan efek perlindungan terhadap kerusakan oksidatif, efektivitas senyawa bioaktif menunjukkan potensi terapeutik ekstrak kulit delima meskipun pada dosis sedang. Gel ekstrak kulit delima meningkatkan kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) melalui mekanisme penyerapan senyawa aktif, aktivasi jalur Nrf2-Keap1, dan peningkatan ekspresi gen antioksidan.⁵⁵ Setelah diaplikasikan, senyawa bioaktif seperti punicalagin dan asam ellagic menembus jaringan dan mengganggu interaksi Nrf2-Keap1, sehingga memungkinkan Nrf2 berpindah ke nukleus dan mengaktifkan ekspresi SOD1 dan SOD2. Peningkatan kadar SOD mempercepat proses detoksifikasi radikal superoksida menjadi zat yang lebih tidak berbahaya, sehingga mengurangi stres oksidatif dan melindungi sel dari kerusakan.⁶² Dengan demikian, gel ekstrak kulit delima 20% berpotensi sebagai agen terapeutik yang efektif dalam meningkatkan

sistem pertahanan antioksidan tubuh.

Pewarnaan *Masson's Trichrome* menunjukkan bahwa paparan UVB merusak serat kolagen, yang terlihat dari penurunan intensitas warna biru dan fragmentasi serat kolagen pada kelompok K2. Pemberian gel EKD 10% (K3) dan 20% (K4) membantu memulihkan densitas dan keteraturan kolagen pada kulit yang terpapar UVB. Gel EKD 20% (K4) menunjukkan efek perlindungan paling signifikan, menjadikannya dosis paling efektif untuk menghambat degradasi kolagen dan mempercepat regenerasi kulit.

Studi lain mendukung temuan ini, menunjukkan bahwa krim ekstrak metanolik *Punica granatum* 20% mampu mencegah penurunan kolagen di dermis kulit mencit yang terpapar UVB. Hal ini menunjukkan peran antioksidan dalam ekstrak delima dalam melindungi struktur kulit dari kerusakan oksidatif.⁶³ Selain itu, formulasi topikal mikroemulsi menggunakan ekstrak *Punica granatum* dapat menurunkan kandungan melanin kulit dan kejadian eritema yang signifikan sehingga dapat diterapkan lebih lanjut pada gangguan pigmentasi kulit.¹⁸ Penelitian menunjukkan aplikasi topikal ekstrak kulit delima (PRE) pada kulit *ex vivo* menurunkan ekspresi COX-2, memberikan efek anti-inflamasi signifikan. Ini mengindikasikan PRE dapat menembus kulit dan memodulasi COX-2, berpotensi memperbaiki peradangan dan nyeri pada kondisi kulit, termasuk luka.¹⁹ Jadi, temuan ini mendukung kesimpulan bahwa gel ekstrak kulit delima bisa meningkatkan ekspresi Nrf2 dan SOD, sekaligus melindungi kolagen kulit dari kerusakan akibat paparan UVB.

Penelitian ini memakai tikus Wistar sebagai hewan uji, yang meskipun telah

terbukti cukup representatif, tidak sepenuhnya mencerminkan respons manusia terhadap paparan sinar UVB dan pengobatan dengan gel ekstrak kulit delima (EKD), penting untuk mempertimbangkan bahwa hasil penelitian ini mungkin tidak sepenuhnya dapat digeneralisasi untuk aplikasi pada manusia. Selain itu, meskipun sebagian besar kelompok menunjukkan hasil yang konsisten, variasi dalam respons individu tikus terhadap perlakuan ekstrak kulit delima dapat mempengaruhi konsistensi hasil. Usia, jenis kelamin, dan status kesehatan tikus berpotensi memengaruhi seberapa efektif perlakuan yang diujikan. Oleh karena itu, perbedaan respons antar individu tikus dalam penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh dari perlakuan tersebut bisa bervariasi tergantung pada karakteristik spesifik masing-masing hewan percobaan.

Penelitian ini berhasil membuktikan pengaruh gel ekstrak kulit delima terhadap ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar yang dipapar sinar UV-B akut. Efektivitas gel ekstrak kulit delima terhadap paparan UV-B kronis perlu diteliti lebih lanjut, karena ada potensi dampaknya.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Gel ekstrak kulit delima (EKD) memengaruhi ekspresi Nrf2 dan kadar SOD pada tikus Wistar yang terpapar UV-B akut.
2. Ekspresi Nrf2 pada tikus yang terpapar UVB akut menunjukkan pengaruh yang signifikan antar kelompok kontrol, basis gel, dan perlakuan.
3. Ekspresi SOD pada tikus yang terpapar UVB akut menunjukkan pengaruh yang signifikan antar kelompok kontrol, basis gel, dan perlakuan.
4. Rata-rata ekspresi Nrf2 dan kadar SOD menunjukkan perbedaan antar kelompok kontrol sehat, basis gel, serta gel ekstrak kulit delima (EKD) 10% dan 20%.

6.2. Saran

1. Penelitian lanjutan dilakukan dengan menggunakan model hewan yang lebih dekat dengan fisiologi manusia, seperti primata non-manusia, atau lebih baik lagi, melalui uji klinis pada manusia.
2. Penelitian mendatang perlu memperhitungkan faktor usia, jenis kelamin, dan kesehatan hewan karena dapat memengaruhi hasil perlakuan. Penyesuaian terhadap faktor-faktor ini dalam desain percobaan dapat membantu menghasilkan data yang lebih konsisten dan representatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tobin DJ. Introduction to skin aging. *J Tissue Viability*. 2017;26(1):37-46. doi:10.1016/j.jtv.2016.03.002
2. Xiao T, Yan Z, Xiao S, Xia Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-020-01755-y
3. Shao Y, He T, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T. Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci*. 2017;39(1):56-65. doi:10.1111/ics.12348
4. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002
5. Singh J, Kaur HP, Verma A, et al. Pomegranate Peel Phytochemistry, Pharmacological Properties, Methods of Extraction, and Its Application: A Comprehensive Review. *ACS Omega*. 2023;8(39):35452-35469. doi:10.1021/acsomega.3c02586
6. Sabraoui T, Khider T, Nasser B, et al. Determination of Punicalagins Content, Metal Chelating, and Antioxidant Properties of Edible Pomegranate (*Punica granatum* L) Peels and Seeds Grown in Morocco. *Int J Food Sci*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/8885889
7. Shinde V, Shinde VM, Shende A, Mahadik K. Evaluation of antioxidant and wound healing potential of pomegranate peel gel formulation. *Article in International Journal of Pharmacognosy*. 2020;7(1):23-28. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.7(1).23-28
8. Kanlayavattanakul M, Chongnativisit W, Chaikul P, Lourith N. Phenolic-rich Pomegranate Peel Extract: In Vitro, Cellular, and in Vivo Activities for Skin Hyperpigmentation Treatment. *Planta Med*. 2020;86(11):749-759. doi:10.1055/a-1170-7785
9. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/930164
10. Ploydaeng M, Rajatanavin N, Pinyowiwat P. 15106 Prevalence of skin cancer, photoprotection behaviors, and photoaging in a southeast Asian population. *J Am Acad Dermatol*. Published online 2020. doi:10.1016/j.jaad.2020.06.651
11. Bjørklund G, Shanida M, Lysiuk R, et al. Natural Compounds and Products from an Anti-Aging Perspective. *Molecules*. 2022;27(20). doi:10.3390/molecules27207084
12. Garcella P, Wijaya TH, Kurniawan DW. Narrative Review: Herbal Nanocosmetics for Anti Aging. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2023;8(1):63. doi:10.20961/jpscr.v8i1.57675
13. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(6):1000-1014. doi:10.1111/pcmr.12986
14. Kong R, Cui Y, Fisher GJ, et al. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin. *Journal of cosmetic dermatology*. Published online 2016.

15. Du L, Li J, Zhang X, Wang L, Zhang W. Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of MAPKs activation. *J Funct Foods*. 2018;43:62-69. doi:10.1016/j.jff.2018.01.028
16. Karim S, Alkreathy HM, Ahmad A, Khan MI. Effects of Methanolic Extract Based-Gel From Saudi Pomegranate Peels With Enhanced Healing Potential on Excision Wounds in Diabetic Rats. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.704503
17. Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;112:30-37. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.014
18. Parveen R, Akhtar N, Mahmood T. Topical microemulsion containing Punica granatum extract: Its control over skin erythema and melanin in healthy Asian subjects. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31(6):351-355. doi:10.5114/pdia.2014.47117
19. Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. Evaluation of wound healing potential of pomegranate (Punica granatum) whole fruit extract on skin burn wound in rats (Rattus norvegicus). *J Adv Vet Anim Res*. 2019;6(2):202-207. doi:10.5455/javar.2019.f333
20. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):585-597. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.005
21. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(17):1727-1745. doi:10.1089/ars.2017.7342
22. Ryšavá A, Vostálová J, Rajnochová Svobodová A. Effect of ultraviolet radiation on the Nrf2 signaling pathway in skin cells. *Int J Radiat Biol*. 2021;97(10):1383-1403. doi:10.1080/09553002.2021.1962566
23. Zhao F, Ci X, Man X, Li J, Wei Z, Zhang S. Food-derived pharmacological modulators of the Nrf2/are pathway: Their role in the treatment of diseases. *Molecules*. 2021;26(4):1-15. doi:10.3390/molecules26041016
24. Shanmugam G, Narasimhan M, Sakthivel R, et al. A biphasic effect of TNF- α in regulation of the Keap1 / Nrf2 pathway in cardiomyocytes. *Redox Biol*. 2016;9:77-89. doi:10.1016/j.redox.2016.06.004
25. Yi M, Cruz Cisneros L, Cho EJ, et al. Nrf2 Pathway and Oxidative Stress as a Common Target for Treatment of Diabetes and Its Comorbidities. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2). doi:10.3390/ijms25020821
26. Wang Z, Zuo Z, Li L, et al. Nrf2 in adipocytes. *Arch Pharm Res*. 2020;43(3):350-360. doi:10.1007/s12272-020-01227-0
27. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *JKK*. 2017;4(1):39-48.
28. Nahhas AF, Abdel-Malek ZA, Kohli I, Braunberger TL, Lim HW, Hamzavi IH. The potential role of antioxidants in mitigating skin hyperpigmentation resulting from ultraviolet and visible light-induced oxidative stress. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2019;35(6):420-428. doi:10.1111/phpp.12423
29. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*.

- 2018;217(6):1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007
30. Gęgotek A, Skrzydlewska E. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch Dermatol Res*. 2015;307(5):385-396. doi:10.1007/s00403-015-1554-2
 31. Altobelli GG, Van Noorden S, Balato A, Cimini V. Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.00183
 32. 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
 33. Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci*. 2018;210:201-208. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.056
 34. Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *J Nutr Metab*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/5297162
 35. Khwairakpam AD, Bordoloi D, Thakur KK, et al. Possible use of Punica granatum (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2018;133:53-64. doi:10.1016/j.phrs.2018.04.021
 36. Akbarnejad F. Dermatology Benefits of Punica Granatum: A Review of the Potential Benefits of Punica Granatum in Skin Disorders. *Asian Journal of Green Chemistry*. 2023;7(3):208-222. doi:10.22034/ajgc.2023.388077.1388
 37. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on Punica granatum L. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016;21(3):221-227. doi:10.1177/2156587215598039
 38. Akbarnejad F. Dermatology Benefits of Punica Granatum: A Review of the Potential Benefits of Punica Granatum in Skin Disorders. *Asian Journal of Green Chemistry*. 2023;7(3):208-222. doi:10.22034/ajgc.2023.388077.1388
 39. Houston DMJ, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. Anti-inflammatory activity of Punica granatum L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;112:30-37. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.014
 40. Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. Evaluation of wound healing potential of pomegranate (Punica granatum) whole fruit extract on skin burn wound in rats (*Rattus norvegicus*). *J Adv Vet Anim Res*. 2019;6(2):202-207. doi:10.5455/javar.2019.f333
 41. Mahdi Mirghazanfari S, Nassireslami E, Sheikh Asadi M, Dadpay M. Evaluation of wound healing activities of pomegranate (Punica granatum-Lythraceae) peel and pulp. *Journal of Research in Medical and Dental Science* |. 2018;6(3). doi:10.24896/jrmds.20186336
 42. Mohania D, Chandel S, Kumar P, et al. Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 996. Springer New York LLC; 2017:71-87. doi:10.1007/978-3-319-56017-5_7
 43. Ullah A, Munir S, Badshah SL, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. 2020;25(22). doi:10.3390/molecules25225243

44. Arief H, Aris M, Bagian W, et al. *Peranan Stres Oksidatif Pada Proses Penyembuhan Luka*. Vol 5.; 2018.
45. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol*. 2015;3(2):57-70. doi:10.3390/jdb3020057
46. 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
47. 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
48. Andarina R, Djauhari T. Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan: Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. JKK. 2017;4(1):39-48.
49. Davinelli S, Bertoglio JC, Polimeni A, Scapagnini G. Cytoprotective Polyphenols Against Chronological Skin Aging and Cutaneous Photodamage. *Curr Pharm Des*. 2018;24(2):99-105. doi:10.2174/1381612823666171109102426
50. Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci*. 2018;210:201-208. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.056
51. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol*. 2015;3(2):57-70. doi:10.3390/jdb3020057
52. 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.
53. Alfiaurrohman A, Herbani M, Andriana D. Efek Perasan Aloe vera L. terhadap Ketebalan Epitel dan Kepadatan Kolagen pada Luka Sayat Tikus Wistar. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*. 2020;7(2):19.
54. Hwang J, Jin J, Jeon S, et al. SOD1 suppresses pro-inflammatory immune responses by protecting against oxidative stress in colitis. *Redox Biol*. 2020;37. doi:10.1016/j.redox.2020.101760
55. Lee MJ, Agrahari G, Kim HY, et al. Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Skin Aging by Promoting Collagen Production through the Activation of AMPK and Nrf2/HO-1 Cascades. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021;141(10):2344-2353.e7. doi:10.1016/j.jid.2021.02.757
56. Stefanson AL, Bakovic M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*. 2014;6(9):3777-3801. doi:10.3390/nu6093777
57. Natasya F. Narrative Review: Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica Granatum L.*) Sebagai Anti-Hiperpigmentasi Kulit. Published online 2022. <https://etd.repository.ugm.ac.id/penelitian/detail/208125>
58. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, et al. *Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging*. Vol 97. Springer Berlin Heidelberg; 2023. doi:10.1007/s00204-023-03562-9
59. Wei M, He X, Liu N, Deng H. Role of reactive oxygen species in ultraviolet-induced photodamage of the skin. *Cell Div*. 2024;19(1):1-9.

- doi:10.1186/s13008-024-00107-z
60. Hidayati N, Hatikhah NA, Putri WE, et al. The effect of long exposure to uvb rays on histological features of wistar rats (*Rattus norvegicus*) in photoaging model. *Bali Medical Journal*. 2023;12(3):3078-3083. doi:10.15562/bmj.v12i3.4393
61. Abdallah HM, Koshak AE, Farag MA, et al. Taif Rose Oil Ameliorates UVB-Induced Oxidative Damage and Skin Photoaging in Rats via Modulation of MAPK and MMP Signaling Pathways. *ACS Omega*. 2023;8(37):33943-33954. doi:10.1021/acsomega.3c04756
62. Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392-400. doi:10.3892/ijmm.2012.1011
63. Suryadewi Soejanto A. *Pemberian Krim Ekstrak Metanolik Buah Delima Merah (Punica Granatum) Menghambat Penurunan Jumlah Kolagen Dermis Kulit Mencit (Mus Gusculus) Yang Dipapar Sinar Ultraviolet B*. *E-Jurnal Indonesian Journal of Anti Aging Medicine*. Vol 1.; 2017. <http://ijaam-unud.org>

