

**PENGARUH SERUM EKSTRAK MULBERRY
(*Morus alba* L.) TERHADAP KADAR
ENDOTHELIN-1 DAN TIROSINASE
(Studi Eksperimental pada Mencit C57BL/6 Hiperpigmentasi
akibat Paparan UV-B)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagai persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedis

**Wilda Nengsih
MBK2423101477**

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

TESIS

PENGARUH SERUM EKSTRAK MULBERRY (*Morus alba* L.) TERHADAP KADAR ENDOTHELIN-1 DAN TIROSINASE (Studi Eksperimental pada Mencit C57BL/6 Hiperpigmentasi Akibat Paparan UV-B)

disusun oleh:

Wilda Nengsih

MBK2423101477

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
Pada tanggal 13 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

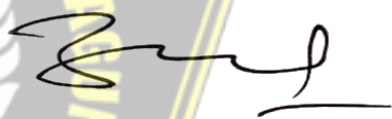
Menyetujui:

Pembimbing I



Dr. Suparmi, S. Si, M. Si (ERT)
NIK. 210 109 126

Pembimbing II



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

Mengetahui,

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



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

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Wilda Nengsih
Tempat, tanggal lahir : Tasikmalaya, 12-08-1987
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK RA Alfalah : lulus tahun 1994
2. SDN Cibungur II : lulus tahun 2000
3. SMPN 3 Tasikmalaya : lulus tahun 2003
4. SMAN 4 Tasikmalaya : lulus tahun 2006
5. Profesi dokter Universitas Malahayati : lulus tahun 2014
6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2024 – sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H Sayat
Ibu : Hj Elo S
2. Nama Suami : dr. Anggri Septianto
3. Nama Anak : 1. Khanza Aufa Nazula
2. Kenzie Alfarendra Narest
3. Khandra Alsheiraz Namair

SURAT PERNYATAAN

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

Semarang, Agustus 2025

(Wilda Nengsih)



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh serum ekstrak mulberry (*Morus alba* L.) terhadap kadar endothelin-1 dan tirosinase: Studi eksperimental pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B)

Tujuan penulisan tesis ini adalah untuk memenuhi syarat dalam mencapai derajat Magister Biomedik pada Program Studi Pasca Sarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dalam proses penulisan tesis ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak sehingga penyusunan tesis ini dapat terselesaikan tepat waktu. Oleh karena itu, ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya 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. FM selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik sekaligus pembimbing II yang telah memberikan dukungan dalam penyusunan tesis ini.
4. Dr. Suparmi, S. Si, M. Si (ERT) selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta motivasi selama penyusunan tesis ini.

5. Penguji sidang proposal yang telah memberikan banyak perhatian, motivasi, serta pencerahan selama penyusunan tesis ini.
6. Orang tua, suami dan anak-anak tercinta yang telah banyak memberikan doa, semangat, dukungan materil maupun immateril sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.
7. 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. Untuk itu saran dan masukannya akan sangat membantu agar tesis ini dapat menjadi lebih baik. Akhirnya penulis mengucapkan banyak terima kasih, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan berkah kepada kita semua.

Semarang, Agustus 2025

Wilda Nengsih

DAFTAR SINGKATAN



AP-1	: <i>Activator Protein 1</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1 Beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
MAPKs	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>
MLPH	: <i>Melanophilin</i>
MMP-1	: <i>Matrix Metalloproteinase-1</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
PIH	: <i>Post-Inflammatory Hyperpigmentation</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCF	: <i>Stem Cell Factor</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*
TRP-1 : *Tirosinase-Related Protein 1*
TRP-2 : *Tirosinase-Related Protein 2*
TYR : *Tirosinase*
UV-B : *Ultraviolet B*



DAFTAR ISI

TESIS	ii
RIWAYAT HIDUP	iii
SURAT PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR SINGKATAN	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
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
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Endotelin-1	9
2.2.1. Definisi Endotelin-1	9
2.2.2. Metabolisme dan aktivasi endotelin-1	10
2.2.3. Endotelin-1 (ET-1) pada hiperpigmentasi.....	12
2.2.4. Keunggulan menganalisis endotelin-1 pada hiperpigmentasi	13
2.2.5. Faktor yang mempengaruhi kadar endotelin-1	14
2.2. Tirosinase	17
2.2.1. Definisi <i>Tirosinase</i>	17
2.2.2. Mekanisme Aktivasi Enzim <i>Tirosinase</i>	18
2.2.3. Regulasi Ekspresi Tirosinase pada hiperpigmentasi	20

2.2.4. Keuntungan menganalisis kadar tirosinase pada hiperpigmentasi	21
2.2.5. Faktor yang mempengaruhi kadar tirosinase.....	23
2.3. Hiperpigmentasi	25
2.3.1 Definisi.....	25
2.3.2. Faktor-faktor Penyebab Hiperpigmentasi	27
2.1.3 Peran UV-B dalam Meningkatkan Melanogenesis.....	29
2.4. Mulberry (<i>Morus alba</i> L.)	31
2.4.1. Klasifikasi dan Karakteristik	31
2.4.2. Kandungan Senyawa Bioaktif Mulberry	33
2.4.3. Efektivitas Mulberry (<i>Morus alba</i> L.) sebagai Inhibitor Tirosinase ...	34
2.5. Hewan Uji Mencit C57BL/6	36
2.5.1. Karakteristik	36
2.5.2 Induksi Hiperpigmentasi	37
2.5.3 Kelebihan Model Hewan Uji Mencit C57BL/6.....	38
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	40
3.1. Kerangka Teori	40
3.2. Kerangka Konsep.....	44
3.3. Hipotesis.....	44
BAB IV METODE PENELITIAN.....	45
4.1 Jenis penelitan dan rancangan penelitian	45
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	46
4.2.1 Variabel Penelitian.....	46
4.2.2 Definisi Operasional.....	47
4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	48
4.3.1 Subjek Penelitian	48
4.3.2 Sampel Penelitian	48
4.4 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian.....	49
4.5 Besar sampel.....	49
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	50
4.7 Prosedur Penelitian.....	52
4.7.1 Pengajuan perizinan Ethical Clearance.....	52
4.7.2 Persiapan sampel	52
4.7.3 Persiapan Bahan Sediaan Ekstrak Dann Serum Buah Mulberry (<i>Morus alba</i>) dan Hidrokuinon.....	53

4.7.4 Prosedur induksi hiperpigmentasi dengan paparan UV-B	53
4.7.5 Pengambilan sampel jaringan kulit Mencit.....	55
4.7.6 Prosedur preparasi jaringan kulit mencit sebelum analisis metode ELISA	55
4.7.7 Prosedur Analisis kadar endotelin-1 dan tirosinase dengan metode ELISA	56
4.8 Tempat dan Waktu Penelitian	58
4.9 Analisa Data	58
4.10 Alur Penelitian	60
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	61
5.1 Hasil Penelitian	61
5.1.1 Gambaran makroskopis dan mikroskopis jaringan kulit mencit menggunakan dermoskop riester ri-scope ri-derma untuk validasi model hiperpigmentasi	62
5.1.2 Kadar Endotelin-1 pada jaringan kulit.....	64
5.1.3 Kadar Tirosinase jaringan kulit.....	66
5.2 PEMBAHASAN	68
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	72
6.1. Kesimpulan.....	72
6.2. Saran	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN	80
1. Lampiran izin etik penelitian	80
2. Lampiran Hasil Penelitian.....	81
3. Lampiran pengolahan data dengan SPSS.....	82
4. Persiapan dan Pemeliharaan Hewan Uji Mencit	89
5. Perubahan Morfologi Kulit Punggung Mencit Selama 6 Hari.....	90
6. Dokumentasi penelitian	91
7. Pengamatan Mikroskopis pada Kulit Mencit Pascapaparan UV-B.....	92
8. Hasil Analisis dan Katalog Serum Ekstrak Mulberry	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Alur Kerangka teori	43
Gambar 3.2 Kerangka konsep	44
Gambar 4.1 Alur Rancangan penelitian	45
Gambar 4.2 Alur Penelitian.	60
Gambar 5.1 Gambaran makroskopis jaringan kulit mencit menggunakan alat dermoskop riester ri-scope ri-derma: (a). Mencit yang tidak dipapar UV-B, (b). Mencit yang dipapar UV-B selama 14 hari menunjukkan tanda-tanda hiperpigmentasi, (c). foto kulit mencit yang tidak dipapar UV-B dengan dermoskop riester ri-scope ri-derma, (c). foto kulit mencit mengalami hiperpigmentasi dengan dermoskop riester ri-scope ri- derma.	63
Gambar 5.2 Kadar endothelin-1 dari jaringan kulit mencit pada tiap kelompok perlakuan	66
Gambar 5.3 Kadar Tirosinase (umol/L) pada tiap kelompok perlakuan.....	67

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas penelitian	7
Tabel 5.1 Kadar Endothelin-1 pada jaringan kulit.....	64
Tabel 5.2 Uji Mann-Whitney kadar Endothelin-1 pada tiap kelompok.....	66
Tabel 5. 3 Kadar Tirosinase pada jaringan kulit	67



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan ultraviolet-B (UV-B) dapat memicu stres oksidatif yang meningkatkan produksi endothelin-1 (ET-1) dan mengaktifasi enzim tirosinase, sehingga mempercepat proses melanogenesis dan menyebabkan hiperpigmentasi kulit. Ekstrak buah mulberry (*Morus alba* L.) mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, anthocyanin, dan vitamin C yang berpotensi sebagai agen depigmentasi alami melalui modulasi jalur ET-1–tirosinase. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh serum ekstrak buah mulberry terhadap kadar ET-1 dan tirosinase pada kulit mencit C57BL/6 yang diinduksi paparan UV-B.

Metode: Penelitian eksperimental murni ini menggunakan 30 ekor mencit jantan galur C57BL/6 yang dibagi menjadi lima kelompok: K1 (kontrol sehat), K2 (paparan UV-B tanpa perlakuan), K3 (UV-B + hidrokuinon 2%), K4 (UV-B + serum ekstrak mulberry 5%), dan K5 (UV-B + serum ekstrak mulberry 10%). Paparan UV-B diberikan selama 14 hari, diikuti perlakuan topikal selama 5 hari. Kadar ET-1 dan tirosinase diukur dengan metode ELISA.

Hasil: Paparan UV-B meningkatkan kadar ET-1 dan tirosinase dibanding kelompok sehat. Pemberian hidrokuinon maupun serum ekstrak mulberry (5% dan 10%) menurunkan kadar ET-1 dan tirosinase dibanding kelompok UV-B tanpa perlakuan. Dosis 5% lebih efektif menurunkan ET-1, sedangkan dosis 10% cenderung lebih rendah kadar tirosinasenya meskipun tidak signifikan secara statistik.

Kesimpulan: Serum ekstrak buah mulberry berpotensi menurunkan kadar ET-1 dan tirosinase pada kulit mencit yang dipapar UV-B, dengan efektivitas berbeda tergantung konsentrasi, sehingga berpeluang dikembangkan sebagai agen depigmentasi alami.

Kata Kunci: *Morus alba*, endothelin-1, tirosinase, UV-B, hiperpigmentasi.

ABSTRACT

Background: Ultraviolet-B (UV-B) exposure can trigger oxidative stress, increasing endothelin-1 (ET-1) production and activating tyrosinase, thereby accelerating melanogenesis and causing skin hyperpigmentation. Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract contains bioactive compounds such as flavonoids, anthocyanins, and vitamin C, which have potential as natural depigmenting agents through modulation of the ET-1–tyrosinase pathway. Accordingly, the present study was designed to evaluate the effects of mulberry fruit extract serum on ET-1 and tyrosinase levels in the skin of C57BL/6 mice subjected to UV-B irradiation.

Methods: This true experimental study used 30 male C57BL/6 mice, divided into five groups: K1 (healthy control), K2 (UV-B exposure without treatment), K3 (UV-B + 2% hydroquinone), K4 (UV-B + 5% mulberry extract serum), and K5 (UV-B + 10% mulberry extract serum). UV-B exposure was given for 14 days, followed by topical treatment for 5 days. ET-1 and tyrosinase levels were measured using the ELISA method.

Results: UV-B exposure increased ET-1 and tyrosinase levels compared to the healthy control group. Administration of hydroquinone or mulberry extract serum (5% and 10%) reduced ET-1 and tyrosinase levels compared to the untreated UV-B group. The 5% dose was more effective in lowering ET-1, whereas the 10% dose tended to produce lower tyrosinase levels, although the difference was not statistically significant.

Conclusion: Mulberry fruit extract serum has the potential to reduce ET-1 and tyrosinase levels in UV-B-exposed mouse skin, with varying effectiveness depending on concentration, suggesting its potential development as a natural depigmenting agent.

Keywords: *Morus alba*, endothelin-1, tyrosinase, UV-B, hyperpigmentation.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan ultraviolet B (UV-B) secara berlebihan memicu hiperpigmentasi, yaitu kondisi meningkatnya produksi melanin yang menyebabkan penggelapan kulit.¹ UV-B merangsang keratinosit untuk memproduksi endotelin-1, yang kemudian berikatan dengan reseptor endotelin B pada melanosit.² Produksi melanin yang berlebihan pada hiperpigmentasi ditandai dengan munculnya bercak atau area kulit yang lebih gelap dibandingkan sekitarnya.³ *Gold standard* terapi hiperpigmentasi yang ada saat ini yaitu hidrokuinon sebagai agen depigmentasi melalui penghambatan aktivitas tirosinase.⁴ Akan tetapi, penggunaan hidrokuinon dalam jangka panjang menimbulkan efek samping yang sulit diatasi berupa iritasi, kemerahan, dan pigmentasi biru-hitam pada kulit (*ochronosis eksogen*).⁵ Oleh karena itu, diperlukan alternatif bahan alami yang lebih aman dan efektif dalam menghambat hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.⁶

Mulberry (*Morus alba L.*) merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan untuk pengobatan tradisional, industri kosmetik, dan bahan pangan. Buah mulberry mengandung flavonoid, polifenol, antosianin, dan terpenoid yang berpotensi sebagai agen depigmentasi alami.⁴ Ekstrak buah mulberry dapat menghambat aktivitas tirosinase sehingga menekan produksi melanin.⁷ Mulberry dilaporkan memiliki aktifitas antiinflamasi untuk mengurangi peradangan akibat paparan UV-B.⁴ Serum dari ekstrak buah mulberry perlu dikembangkan sebagai

alternatif terapi topikal yang efektif dan lebih aman dibandingkan dengan hidrokuinon. Serum memiliki tekstur ringan, ukuran molekul kecil, cepat meresap ke dalam lapisan epidermis dan dermis kulit.⁸

Efek antioksidan dan antinflamasi ekstrak mulberry telah dilaporkan oleh beberapa penelitian terdahulu. Uji aktifitas antioksidan flavonoid dan antosianin dari ekstrak mulberry menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 407,31 $\mu\text{g/mL}$, sehingga diharapkan memiliki efektivitas tinggi dalam mengurangi hiperpigmentasi.⁹ Penelitian lainnya melaporkan bahwa *morachalcone* A dan 2,4,2',4'-*tetrahydroxychalcone* dalam ekstrak mulberry dapat menghambat tirosinase hingga 757,26 kali lebih kuat dibandingkan asam kojat. Penggunaan ekstrak mulberry secara topikal dapat mengurangi produksi $\text{TNF-}\alpha$ sebesar 40-60% dan menekan ekspresi enzim tirosinase dalam melanosit hingga 50%, sehingga mengurangi hiperpigmentasi secara signifikan.¹⁰ Flavonoid, polifenol, antosianin, dan terpenoid dalam ekstrak mulberry diketahui dapat menghambat aktivasi *Nuklear factor-kappa beta* (NF- κB), dan mengurangi inflamasi kronis. Penurunan inflamasi secara tidak langsung menekan produksi endotelin-1 oleh keratinosit, sehingga mengurangi stimulasi terhadap melanosit. Kandungan kuersetin dan resveratrol dalam ekstrak mulberry mampu menetralkan *reactive oxygen species* (ROS), menghambat aktivasi *Microphthalmia-Associated Transcription Factor* (MITF), dan menurunkan aktivitas tirosinase. Arbutin dan flavonoid dalam mulberry berperan sebagai inhibitor kompetitif yang menekan ekspresi MITF, *Tirosinase-Related Protein 1* (TRP-1) dan TRP-2, sehingga menghambat hiperpigmentasi melalui jalur endotelin-1/MITF.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian serum ekstrak mulberry terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada model mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan UV-B. Mencit C57BL/6 dipilih sebagai hewan coba karena memiliki respons imun yang baik, kecenderungan genetik terhadap hiperpigmentasi dan sensitivitas tinggi terhadap paparan UV-B. Kulit mencit yang dicukur bulunya dipapar UV-B melalui penyinaran lampu UV-B intensitas $180\text{mJ}/\text{cm}^2$ selama 10 menit/ hari, 3 hari dalam seminggu selama 14 hari. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendorong pengembangan ekstrak buah mulberry sebagai sediaan *cosmeceutical* untuk terapi hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh serum ekstrak mulberry (*Morus alba* L.) terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat dipaparan UV-B?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian serum ekstrak mulberry terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

- a) Mengetahui kadar endotelin-1 pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B yang diberikan serum ekstrak mulberry 5%, 10%, dan hidrokuinon 2% dibandingkan dengan kelompok mencit C57BL/6 sehat dan kelompok mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.
- b) Mengetahui kadar tirosinase pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B yang diberikan serum ekstrak mulberry 5%, 10%, dan hidrokuinon 2% dibandingkan dengan kelompok mencit C57BL/6 sehat dan kelompok mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.
- c) Mengetahui konsentrasi serum ekstrak mulberry yang paling berpengaruh dalam terapi hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah terhadap peran ekstrak mulberry dalam menurunkan kadar endotelin-1 dan tirosinase yang berperan dalam mekanisme antiinflamasi dan antioksidan dalam terapi hiperpigmentasi kulit.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan serum berbasis ekstrak mulberry sebagai penanganan hiperpigmentasi

kulit, sehingga dapat dimanfaatkan dalam pengembangan produk *cosmeceutical* berbasis ilmiah pengganti hidrokuinon.

1.5. Originalitas Penelitian

Originalitas penelitian terdahulu oleh Riski *et al* (2020) telah meneliti formulasi krim dari fitosom ekstrak daun mulberry (*Morus alba* L.) dengan variasi konsentrasi 2%, 3%, dan 4%. Hasil uji uji penyimpanan, organoleptis, tipe emulsi, pH, viskositas, uji daya sebar, dan uji daya lekat menunjukkan sediaan krim bersifat stabil. Aktivitas antioksidan krim yang dihasilkan diuji secara *in vitro*.¹¹ Penelitian yang akan dilakukan menggunakan serum ekstrak buah mulberry dengan konsentrasi 5%, dan 10%, sedangkan aktifitas antioksidan diuji secara *in vivo* pada mencit hiperpigmentasi paparan UV-B.

Hamed *et al* (2021) meneliti secara *in vitro* aktivitas penghambatan tirosinase ekstrak mulberry dengan hasil yang mendekati aktifitas asam kojat.¹² Penelitian efek hiperpigmentasi ini menggunakan desain *in vivo* pada mencit (C57BL/6) hiperpigmentasi akibat paparan UV-B dengan biomarker kadar endotelin-1 dan tirosinase.

Budiman *et al* (2023) melaporkan bahwa gel antioksidan ekstrak mulberry hitam dengan konsentrasi 0.61% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.¹³ Berbeda dengan penelitian ini menggunakan sediaan serum ekstrak buah mulberry merah dengan konsentrasi 5% dan 10%. Kucuk *et al* (2024) menguji secara *in vitro* formulasi serum ekstrak mulberry 2% dimana, menunjukkan penghambatan tirosinase, menurunkan kadar melanin, dan kadar TNF- α .¹⁴

Berbeda dengan penelitian ini menggunakan sediaan serum ekstrak mulberry konsentrasi 5% dan 10%.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak mulberry memiliki kandungan antioksidan dan antiinflamasi yang tinggi serta mampu menurunkan inflamasi dan aktivitas tirosinase secara signifikan. Meskipun demikian, sebagian besar studi tersebut masih terbatas pada skala *in vitro*, sehingga belum memberikan gambaran yang utuh mengenai efek biologis ekstrak mulberry dalam sistem yang lebih kompleks seperti *in vivo*, khususnya dalam bentuk aplikasi topikal seperti serum. Penggunaan serum sebagai media penghantaran bahan aktif juga memiliki sejumlah kelemahan yang perlu dipertimbangkan. Serum umumnya berbasis air atau campuran air-alkohol yang mudah menguap saat diaplikasikan ke permukaan kulit, terutama jika tidak dilapisi dengan pelembap atau bahan oklusif. Banyak bahan aktif dalam serum, termasuk senyawa alami seperti flavonoid dari ekstrak mulberry, memiliki stabilitas rendah dan rentan terdegradasi akibat paparan cahaya, udara, dan suhu, yang pada akhirnya dapat menurunkan efektivitasnya seiring waktu. Meskipun serum memiliki konsistensi ringan dan cepat menyerap, kemampuan penetrasinya ke lapisan kulit yang lebih dalam, seperti dermis, masih terbatas, terutama untuk molekul berukuran besar atau bersifat hidrofilik tanpa dukungan teknologi penghantaran khusus seperti liposom, nanoemulsi, atau sistem berbasis lipid. Penelitian ini bertujuan tidak hanya untuk menilai efektivitas bahan alami, tetapi juga mengevaluasi secara langsung pengaruh pemberian serum ekstrak mulberry (*Morus alba* L.) terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada mencit

strain C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan UV-B, sehingga diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai potensi serta keterbatasan aplikasi topikal dari ekstrak tersebut dalam konteks biologis yang lebih mendekati kondisi kulit manusia. (Tabel 1.1)

Tabel 1.1 Originalitas penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Study	Hasil
1.	Riski <i>et al</i> (2020) ¹¹	Formulasi Krim Pemutih Dari Fitosom Daun Murberry (<i>Morus alba</i> L.)	Studi eksperimental in vitro	Krim fitosom ekstrak daun mulberry memiliki IC ₅₀ sebesar 407,31 µg/mL, menandakan kemampuannya dalam menghambat produksi melanin dan mengurangi hiperpigmentasi.
2.	Hamed <i>et al</i> (2021) ¹²	Screening Of Commonly Used Plant Extracts In Jordanian Skin Lightening Folkloric Recipes For Their <i>Tyrosinase Inhibitory Activity: An In Vitro Study</i>	Studi eksperimental in vitro	Kandungan flavonoid, stilben, dan kalkon dalam ekstrak mulberry memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang tinggi, dengan efektivitas lebih dari 70% dalam beberapa uji in vitro, mendekati efektivitas asam kojat.
3.	Budiman <i>et al</i> (2023) ¹³	Formulation of Antioxidant Gel from Black Mulberry Fruit Extract (<i>Morus nigra</i> L.)	Studi eksperimental in vitro	Gel antioksidan ekstrak mulberry hitam dengan konsentrasi 0.61% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan IC ₅₀ sebesar 104,65 ppm, menunjukkan bahwa mulberry hitam ini efektif untuk melindungi kulit dari radikal bebas dan hiperpigmentasi akibat sinar UV
4.	Kucuk <i>et al</i> (2024) ¹⁴	Effect of Bacterial Nanocellulose and Plant-Containing	Studi eksperimental	Ekstrak mulberry 2%, menunjukkan penghambatan tirosinase

<i>Facial Serum on Hyperpigmentation in in-vitro Conditions</i>	ental in yang signifikan, vitro menurunkan kadar melanin sekitar 30-45%, serta menurunkan kadar TNF- α hingga 28-40%
---	---



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Endotelin-1

2.2.1. Definisi Endotelin-1

Endotelin-1 (ET-1) adalah salah satu bentuk peptida endotelin yang berfungsi sebagai vasokonstriktor alami terkuat dalam tubuh manusia. Peptida ini terdiri dari 21 asam amino dan pertama kali ditemukan pada kultur sel endotel manusia. Selain diproduksi oleh sel endotel, ET-1 juga dapat dibuat oleh sel lain seperti keratinosit, melanosit, sel otot polos, dan sel epitel.

ET-1 berperan utama dalam mengatur tonus pembuluh darah dan tekanan darah melalui dua jenis reseptor, yaitu ETA dan ETB. Aktivasi ETA biasanya menyebabkan penyempitan pembuluh darah dan pertumbuhan sel, sementara aktivasi ETB dapat memicu pelebaran pembuluh darah melalui pelepasan nitric oxide (NO) dan prostasiklin, serta membantu membersihkan ET-1 dari sirkulasi.¹⁵

Endotelin-1 (ET-1) tidak hanya mengatur aliran darah di kulit, tetapi juga berperan penting dalam mengendalikan stres oksidatif, peradangan, dan proses pigmentasi. Ketika kulit terpapar ultraviolet B (UV-B), produksi ET-1 di keratinosit meningkat, lalu ET-1 ini mengaktifkan reseptor ETB pada melanosit. Aktivasi ini memicu serangkaian reaksi di dalam sel, seperti peningkatan kadar kalsium, aktivasi protein kinase C (PKC), dan fosforilasi jalur ERK1/2, yang bersama-sama meningkatkan aktivitas enzim tirosinase dan

produksi melanin, sehingga menyebabkan kulit menjadi lebih gelap setelah terpapar UV-B. Selain itu, ET-1 juga berperan dalam memperkuat peradangan lokal dengan merangsang produksi molekul-molekul proinflamasi seperti interleukin-6 (IL-6) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), terutama saat kulit mengalami stres akibat lingkungan seperti paparan sinar UV.^{16,17}

2.2.2. Metabolisme dan aktivasi endotelin-1

Sintesis Endotelin-1 (ET-1) dimulai dari pembentukan prepro-endotelin-1 (prepro-ET-1), suatu molekul prekursor besar yang kemudian mengalami pemotongan proteolitik untuk menghasilkan pro-endotelin. Selanjutnya, pro-endotelin diproses menjadi bentuk big-endotelin, yang terdiri atas 38 hingga 39 asam amino. Proses aktivasi big-endotelin menjadi bentuk aktif Endotelin-1 melibatkan enzim *Endothelin-Converting Enzyme* (ECE), yang memotong big-endotelin sehingga menghasilkan ET-1 aktif yang terdiri dari 21 asam amino. Setelah sintesis, ET-1 disekresikan secara parakrin, yaitu bekerja secara lokal di sekitar area tempat diproduksi, tanpa beredar luas di dalam sirkulasi darah. Mekanisme inaktivasi atau clearance ET-1 sebagian besar dilakukan melalui reseptor ETB pada sel endotel vaskular, yang mengikat dan mengeliminasi ET-1 dari sirkulasi. Selain itu, sebagian kecil ET-1 dimetabolisme oleh enzim-enzim protease yang terdapat di plasma dan jaringan tubuh. ET-1 memiliki waktu paruh yang sangat pendek di dalam sirkulasi, yakni hanya sekitar 1- 7 menit, sehingga efek biologisnya bersifat cepat dan lokal.

Aktivasi Endotelin-1 (ET-1) setelah paparan sinar ultraviolet (UV), terutama UV-B. Selain berperan sebagai vasokonstriktor yang kuat, ET-1 juga berfungsi sebagai mediator parakrin yang mampu menstimulasi aktivitas melanosit, yaitu sel yang bertanggung jawab atas produksi melanin di lapisan epidermis kulit.¹⁶ Setelah kulit terpapar UV-B, keratinosit akan memproduksi dan melepaskan ET-1 ke lingkungan mikro kulit. ET-1 kemudian berikatan dengan reseptor Endotelin tipe B (ETBR) yang terdapat pada permukaan melanosit. Ikatan ini mengaktifkan jalur transduksi sinyal intraseluler, dimulai dari aktivasi protein G yang selanjutnya merangsang enzim phospholipase C (PLC). PLC memicu pembentukan molekul pensinyalan sekunder inositol trifosfat (IP3) dan diasilgliserol (DAG), yang meningkatkan kadar kalsium intraseluler serta mengaktifkan protein kinase C (PKC). Aktivasi jalur ini mendorong terjadinya proliferasi dan migrasi melanosit serta meningkatkan proses melanogenesis atau sintesis melanin.^{16,17}

Jalur ET-1 juga bekerja secara sinergis dengan faktor-faktor lain seperti α -melanocyte-stimulating hormone (MSH), stem cell factor (SCF), dan basic fibroblast growth factor (bFGF). Sinergisme ini memperkuat aktivitas enzim tirosinase, yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis melanin. Akibatnya, terjadi peningkatan produksi melanin secara signifikan, distribusi melanin yang lebih luas di epidermis, serta perubahan warna kulit menjadi lebih gelap, yang secara klinis tampak sebagai hiperpigmentasi.^{16,18}

Endotelin-1 (ET-1) memainkan peran multifaset dalam mempertahankan homeostasis kulit. Gangguan regulasi jalur ET-1 telah dikaitkan dengan berbagai kondisi patologis seperti hipertensi, fibrosis, kanker kulit, serta kelainan pigmentasi. Modulasi aktivitas Endotelin-1 menjadi target potensial dalam pengembangan terapi dermatologis di masa depan.

2.2.3. Endotelin-1 (ET-1) pada hiperpigmentasi

Endotelin-1 (ET-1) merupakan peptida vasokonstriktor yang diproduksi secara endogen oleh berbagai tipe sel, termasuk keratinosit pada kulit. Salah satu fungsi penting ET-1 di kulit adalah sebagai mediator parakrin dalam regulasi melanogenesis, yakni proses biosintesis melanin oleh melanosit. Paparan ultraviolet B (UV-B) secara berlebihan telah terbukti merangsang keratinosit untuk meningkatkan ekspresi dan sekresi ET-1 sebagai respons terhadap stres oksidatif dan inflamasi.^{19,20} Setelah dilepaskan, ET-1 akan berikatan dengan reseptor spesifiknya, yaitu *Endothelin B receptor* (EDNRB) yang banyak diekspresikan pada permukaan melanosit. Ikatan ini memicu aktivasi jalur pensinyalan intraseluler yang berujung pada peningkatan ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). MITF kemudian mengatur ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam melanogenesis, termasuk gen tirosinase, TRP-1, dan TRP-2.¹⁶

Peningkatan kadar Endotelin-1 (ET-1) telah dikaitkan dengan proses hiperpigmentasi, baik secara fisiologis (misalnya pasca inflamasi atau paparan UV) maupun patologis (seperti pada kondisi melasma atau lentigo). ET-1 menjadi target penting dalam pengembangan agen-agen depigmentasi.¹⁶

2.2.4. Keunggulan menganalisis endotelin-1 pada hiperpigmentasi

Analisis Endotelin-1 (ET-1) memiliki sejumlah keunggulan yang menjadikannya penting dalam studi hiperpigmentasi kulit. Salah satu keunggulan utamanya adalah kemampuannya menjelaskan mekanisme molekuler yang spesifik, terutama hubungan parakrin antara keratinosit dan melanosit yang menjadi kunci dalam proses pigmentasi pasca paparan UV. ET-1 juga merupakan biomarker yang sangat sensitif terhadap paparan UV-B karena diekspresikan dengan cepat dan signifikan, menjadikannya penanda awal (*early marker*) yang efektif dalam mendeteksi perubahan respons seluler terhadap radiasi UV.^{21,22}

ET-1 berperan penting dalam berbagai patologi, sehingga menjadi kandidat potensial untuk intervensi terapeutik. Pemahaman mendalam mengenai perannya dalam jalur pigmentasi membuka peluang pengembangan terapi depigmentasi dengan menargetkan ET-1 atau reseptornya, *Endothelin B Receptor* (ETBR), khususnya pada kondisi seperti melasma, solar lentigo, dan hiperpigmentasi pasca-inflamasi (PIH). Dari sisi teknis, ekspresi ET-1 dapat diukur secara kuantitatif melalui teknik seperti immunohistokimia (IHC), ELISA, atau qPCR, sehingga memberikan data yang lebih objektif dan terukur dibandingkan observasi visual.^{16,22}

Faktor lain yang berperan secara tidak langsung dalam stimulasi proliferasi dan migrasi melanosit serta peningkatan sintesis melanin melalui aktivasi tirosinase, menjadikannya indikator yang relevan secara biologis. Pengukuran ET-1 dalam penelitian juga berkontribusi pada validasi model hiperpigmentasi

yang lebih kuat, baik pada hewan uji maupun kultur sel, sekaligus memperkuat nilai translasi penelitian ke aplikasi klinis. ET-1 memiliki keunggulan dalam hal kompatibilitas, karena dapat bekerja sinergis dengan faktor lain seperti α -MSH, SCF, dan bFGF. Hal ini memungkinkan ET-1 untuk dianalisis dalam studi multiparametrik guna memberikan gambaran yang lebih menyeluruh tentang regulasi pigmentasi kulit.^{19,22}

2.2.5. Faktor yang mempengaruhi kadar endotelin-1

Paparan sinar ultraviolet, terutama UV-B, memicu keratinosit untuk meningkatkan sekresi endotelin-1 (ET-1), sebuah peptida yang kemudian berikatan dengan reseptor ETB pada melanosit.²³ Aktivasi reseptor ini menstimulasi jalur transduksi sinyal seperti MITF-GPNMB, yang berperan penting dalam sintesis melanin serta pembentukan dan pematangan melanosom. Mekanisme ini menjelaskan terjadinya hiperpigmentasi yang diinduksi oleh paparan UV. Selain keratinosit, sel endotel mikrovaskular di dermis juga merupakan sumber ET-1, yang turut berkontribusi terhadap peningkatan melanogenesis melalui aktivasi reseptor ETB dan jalur MAPK pada melanosit. Temuan ini mengindikasikan bahwa faktor vaskular juga berperan dalam regulasi pigmentasi kulit.²⁴

Endotelin-1 (ET-1) memainkan peran sentral dalam regulasi hiperpigmentasi kulit melalui berbagai mekanisme biologis. Salah satu pemicunya adalah aktivasi neuropeptida substance P, yang dilepaskan selama proses penyembuhan luka atau kondisi stres. Neuropeptida ini merangsang aktivitas enzim endothelin-converting enzyme 1 (ECE1), yang meningkatkan

produksi ET-1 dan pada akhirnya memicu proses melanogenesis pada melanosit. Selain itu, sel endotel dari pembuluh darah dermal juga berkontribusi terhadap kadar ET-1 dengan melepaskan peptida ini ke lingkungan sekitar. ET-1 kemudian berinteraksi dengan reseptor ET-B pada melanosit, menstimulasi ekspresi protein penting dalam pembentukan pigmen seperti MITF dan tirosinase, serta mempercepat produksi melanin. Tak hanya itu, ET-1 juga terlibat dalam pembentukan dan transportasi melanosom, organel tempat penyimpanan melanin, sehingga memperkuat dan mempertahankan kondisi hiperpigmentasi. Mekanisme ini diperkuat melalui aktivasi jalur sinyal MITF–GPNMB, yang mengatur ekspresi gen-gen kunci dalam pematangan melanosom. Secara keseluruhan, beragam jalur ini menunjukkan bahwa ET-1 berperan besar dalam memicu dan mempertahankan pigmentasi kulit, baik akibat rangsangan eksternal seperti sinar UV maupun respon internal seperti stres dan peradangan.^{15,24} Berikut faktor yang mempengaruhi kadar endotelin-1 (ET-1):

a. Paparan ultraviolet (UV), khususnya UV-B

Paparan UV-B merangsang keratinosit untuk meningkatkan produksi ET-1. ET-1 kemudian mengikat reseptor ETB pada melanosit dan mengaktifkan jalur sinyal seperti MITF dan GPNMB, sehingga terjadi peningkatan sintesis melanin yang berujung pada hiperpigmentasi.

b. Aktivasi neuropeptida Substance P

Neuropeptida Substance P dilepaskan dalam kondisi stres, peradangan, atau proses penyembuhan luka. Molekul ini mengaktifkan endothelin-converting

enzyme-1 (ECE1), yang mengubah prekursor menjadi ET-1 aktif, sehingga merangsang melanogenesis.

c. Aktivitas sel endotel mikrovaskular

Sel-sel endotel pada pembuluh darah dermal juga menghasilkan ET-1, terutama ketika terjadi aktivasi vaskular. ET-1 ini kemudian mengaktifkan reseptor ETB pada melanosit dan menstimulasi jalur MAPK, yang meningkatkan produksi melanin.

d. Proses peradangan kulit (inflamasi)

Peradangan akibat jerawat, luka, atau dermatitis meningkatkan mediator inflamasi yang merangsang produksi ET-1. Peningkatan ET-1 ini berkontribusi pada hiperpigmentasi pasca-inflamasi (PIH) melalui peningkatan ekspresi tirosinase dan protein melanogenesis lainnya.

e. Stres psikologis dan fisiologis

Stres memicu pelepasan neuropeptida dan mediator inflamasi seperti Substance P dan interleukin, yang meningkatkan aktivitas ECE1 serta sekresi ET-1, sehingga memperkuat pigmentasi terutama pada individu dengan stres kronis.

f. Hipoksia (kekurangan oksigen jaringan)

Hipoksia akibat gangguan sirkulasi atau tekanan lokal pada jaringan kulit meningkatkan ekspresi ET-1 dari sel endotel sebagai respons adaptif, yang selanjutnya menstimulasi melanogenesis.

g. Paparan polusi dan stres oksidatif lingkungan

Faktor eksternal seperti polusi udara, asap rokok, dan bahan kimia menyebabkan stres oksidatif pada kulit. Hal ini menstimulasi keratinosit dan sel endotel untuk memproduksi lebih banyak ET-1, yang berisiko memicu pigmentasi tidak merata atau melasma.

h. Perubahan hormon (estrogen dan progesteron)

Peningkatan kadar hormon seperti pada kehamilan atau konsumsi kontrasepsi hormonal dapat meningkatkan produksi ET-1 secara tidak langsung, sehingga memicu melanogenesis dan memunculkan melasma hormonal.

i. Infeksi kulit

Infeksi bakteri atau jamur pada kulit dapat merangsang respons imun dan inflamasi, yang pada gilirannya meningkatkan produksi ET-1. Kondisi ini dapat menyebabkan hiperpigmentasi pasca-infeksi akibat peningkatan aktivitas melanosit.

2.2. Tirosinase

2.2.1. Definisi *Tirosinase*

Tirosinase merupakan enzim yang mengandung ion tembaga dan memainkan peran sentral dalam jalur biosintesis melanin, yaitu pigmen biologis yang menentukan fenotipe warna kulit, rambut, dan mata pada manusia maupun organisme lainnya. Enzim ini termasuk dalam klasifikasi *oksidoreduktase* dan bertanggung jawab mengkatalisis dua reaksi utama dalam proses melanogenesis, yaitu: (1) hidroksilasi L-tirosin menjadi L-3,4-

dihidroksifenilalanin (L-DOPA) dan (2) oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon.²⁵

Dopakuinon yang terbentuk dari oksidasi L-DOPA selanjutnya mengalami serangkaian reaksi kimia non-enzimatik yang akhirnya menghasilkan melanin, yaitu pigmen utama yang menentukan warna kulit, rambut, dan mata.²⁶ Enzim tirosinase secara spesifik berlokasi di dalam melanosom, yaitu organel yang terdapat dalam sel melanosit yang berfungsi untuk mensintesis, menyimpan, dan mendistribusikan melanin.²⁷ Aktivitas tirosinase memiliki peran kunci dalam mengatur laju biosintesis melanin, sehingga secara luas dikenal sebagai enzim pembatas laju (*rate-limiting enzyme*) dalam proses melanogenesis. Selain fungsi fisiologisnya dalam pigmentasi, tirosinase juga memiliki signifikansi dalam bidang kosmetik dan medis. Inhibisi aktivitas enzim ini merupakan strategi yang umum digunakan dalam penanganan gangguan hiperpigmentasi kulit, seperti melasma dan lentigo senilis. Berbagai senyawa, baik yang berasal dari sumber alami maupun hasil sintesis kimia, telah diketahui sebagai inhibitor tirosinase, antara lain asam kojik, hidrokuinon, dan arbutin.²⁵

2.2.2. Mekanisme Aktivasi Enzim *Tirosinase*

Tirosinase merupakan enzim kunci dalam proses biosintesis melanin, yang berperan dalam katalisis reaksi oksidasi L-tirosin dan L-DOPA menjadi dopakuinon. Proses ini dimulai dengan hidroksilasi L-tirosin menjadi L-DOPA, yang kemudian dikatalisis lebih lanjut oleh tirosinase menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon ini kemudian mengalami serangkaian reaksi non-

enzimatik yang menghasilkan eumelanin (pigmen hitam atau coklat) dan feomelanin (pigmen kuning atau merah) tergantung pada faktor lingkungan seperti keberadaan ion logam dan kadar glutathione.²⁸

Struktur aktif tirosinase terdiri dari dua ion tembaga (Cu^{2+}) yang berikatan dengan residu histidin di dalam situs katalitik enzim. Tirosinase dapat berada dalam tiga bentuk oksidasi utama, yaitu deoksi-tirosinase, oksitirosinase, dan metitrosinase. Bentuk oksitirosinase merupakan yang paling aktif dalam mengkatalisis oksidasi tirosin dan L-DOPA. Aktivitas enzim ini sangat dipengaruhi oleh lingkungan fisiologis, seperti pH, ketersediaan oksigen, dan interaksi dengan protein terkait tirosinase (TRP-1 dan TRP-2), yang berperan dalam stabilisasi enzim dan regulasi perbedaan antara eumelanin dan feomelanin.²⁹

Tirosinase bekerja melalui mekanisme reaksi berjenjang dalam proses melanogenesis, melibatkan beberapa enzim tambahan. Enzim ini mengkatalisis perubahan tirosin menjadi dopakronon, yang kemudian diubah menjadi melanin oleh enzim-enzim lain seperti *tyrosinase-related protein-1* (TRP-1) dan *tyrosinase-related protein-2* (TRP-2). Mekanisme ini memastikan pembentukan melanin secara bertahap dan terkontrol untuk memberikan warna pada kulit, rambut, dan mata. Setelah terbentuknya dopakuinon, reaksi spontan akan menghasilkan leukodopakrom, yang selanjutnya dapat dikonversi menjadi eumelanin atau feomelanin melalui jalur yang dikontrol oleh enzim tirosinase terkait. Aktivitas tirosinase dikendalikan melalui mekanisme penghambatan oleh

agen eksternal, seperti inhibitor tirosinase alami atau sintetis yang menargetkan situs aktif enzim dengan mekanisme kompetitif atau non-kompetitif.³⁰

Faktor eksternal seperti radiasi UV dapat menginduksi ekspresi tirosinase melalui aktivasi jalur sinyal yang dimediasi oleh *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF). MITF berperan sebagai regulator utama dalam transkripsi gen tirosinase, TRP-1, dan TRP-2, sehingga meningkatkan produksi melanin sebagai respons terhadap stres lingkungan.³¹

2.2.3. Regulasi Ekspresi Tirosinase pada hiperpigmentasi

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) adalah faktor transkripsi utama yang mengontrol ekspresi enzim tirosinase (TYR), yang berperan dalam biosintesis melanin. MITF mengikat elemen promotor spesifik dalam gen TYR melalui domain *basic helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-LZ), yang memungkinkan aktivasi transkripsi enzim tirosinase serta protein tirosinase terkait lainnya, seperti *tyrosinase-related protein 1* (TRP-1) dan *tyrosinase-related protein 2* (TRP-2).³² Aktivasi MITF secara langsung menentukan jumlah tirosinase yang diproduksi dalam melanosit, yang pada akhirnya mempengaruhi pigmentasi kulit. Sebaliknya, downregulasi atau mutasi pada MITF dapat menyebabkan gangguan pigmentasi, seperti vitiligo atau albinisme, akibat berkurangnya produksi tirosinase dan enzim melanogenik lainnya.³³

Ekspresi MITF dikendalikan oleh berbagai jalur pensinyalan intraseluler, termasuk *cAMP response element-binding protein* (CREB), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ERK, serta jalur Wnt/ β -catenin. Jalur CREB diaktifkan

melalui stimulasi oleh *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), yang memicu fosforilasi MITF dan meningkatkan transkripsi gen tirosinase.³⁴ Sementara itu, jalur MAPK/ERK memiliki efek ganda dalam regulasi MITF, tergantung pada tingkat dan durasi aktivasi sinyal. Aktivasi transien MAPK/ERK dapat meningkatkan ekspresi MITF dan mendukung melanogenesis, sedangkan aktivasi yang berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi MITF melalui jalur *ubiquitin-proteasome*, yang berujung pada penurunan ekspresi tirosinase dan penghambatan produksi melanin.³⁵

Ekspresi MITF dan tirosinase dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti paparan sinar ultraviolet (UV) dan stres oksidatif. Sinar UV menginduksi aktivasi CREB melalui jalur *protein kinase A* (PKA), yang meningkatkan ekspresi MITF dan merangsang produksi melanin sebagai respons perlindungan terhadap kerusakan akibat radiasi UV.³³

Berbagai faktor epigenetik juga berperan dalam mengontrol ekspresi MITF dan tirosinase. Studi terbaru menunjukkan bahwa regulasi *microRNA* (miRNA), seperti *miR-137* dan *miR-218*, dapat menekan ekspresi MITF dengan menghambat translasinya, yang pada akhirnya mengurangi produksi tirosinase dan melanin.³⁵

2.2.4. Keuntungan menganalisis kadar tirosinase pada hiperpigmentasi

Tirosinase sebagai enzim tembaga yang berperan dalam tahapan awal biosintesis melanin, merupakan faktor penentu dalam regulasi pigmentasi kulit. Peningkatan aktivitas enzim ini berkorelasi langsung dengan produksi melanin yang berlebihan, yang menjadi dasar utama terbentuknya berbagai kondisi

hiperpigmentatif, seperti melasma, hiperpigmentasi pasca-inflamasi (PIH), dan lentigo. Pengukuran kadar tirosinase tidak hanya memberikan pemahaman mendalam terhadap mekanisme molekuler yang melandasi gangguan pigmentasi, tetapi juga dapat berfungsi sebagai indikator diagnostik yang akurat.³⁶

Analisis tirosinase memberikan kontribusi penting dalam evaluasi efektivitas terapi depigmentasi. Agen terapeutik yang bekerja sebagai inhibitor tirosinase, seperti asam kojik, arbutin, dan hidrokuinon, menunjukkan efikasi melalui penurunan aktivitas enzim ini. Pemantauan kadar tirosinase sebelum dan sesudah intervensi terapeutik memungkinkan penilaian objektif terhadap respons pasien, sekaligus memfasilitasi individualisasi pengobatan. Selain itu, dalam ranah penelitian dan pengembangan, studi mengenai aktivitas tirosinase memungkinkan eksplorasi senyawa bioaktif baru yang berpotensi sebagai agen depigmentasi, baik dari sumber alami maupun sintetis, melalui pendekatan yang lebih terarah secara molekuler.²⁶

Di samping aspek terapeutik, tirosinase juga menunjukkan potensi sebagai biomarker prognostik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa peningkatan kadar tirosinase dalam jaringan atau serum dapat berkorelasi dengan progresivitas lesi pigmenter tertentu, termasuk kondisi neoplastik seperti melanoma. Analisis enzim ini juga membuka peluang untuk mengkaji interaksi tirosinase dengan berbagai faktor modulator, seperti hormon, stres oksidatif, dan sinyal inflamasi, yang secara sinergis memengaruhi dinamika melanogenesis. Dengan demikian, pengukuran kadar tirosinase tidak hanya relevan secara klinis,

tetapi juga fundamental dalam pengembangan strategi pencegahan dan terapi gangguan hiperpigmentasi berbasis bukti molekuler.^{25,27}

2.2.5. Faktor yang mempengaruhi kadar tirosinase

Aktivitas tirosinase sebagai enzim kunci dalam proses melanogenesis sangat dipengaruhi oleh berbagai determinan fisiologis dan lingkungan, yang berperan dalam patogenesis hiperpigmentasi.³

a. Paparan ultraviolet (UV)

UV-B, merupakan faktor eksternal utama yang meningkatkan ekspresi gen tirosinase melalui aktivasi keratinosit. Paparan UV-B merangsang pelepasan mediator parakrin seperti *alpha-melanocyte-stimulating hormone* (α -MSH) dan ET-1, yang kemudian mengaktifasi jalur MC1R–cAMP–PKA–CREB. Jalur ini memicu peningkatan ekspresi *Microphthalmia-Associated Transcription Factor* (MITF), yaitu faktor transkripsi utama pengatur tirosinase, yang pada akhirnya meningkatkan produksi melanin dan menyebabkan hiperpigmentasi. Mekanisme ini berujung pada peningkatan sintesis melanin sebagai respons protektif terhadap stres oksidatif dan kerusakan DNA yang diinduksi sinar UV.²⁵

b. Aktivasi MITF

MITF merupakan kunci dalam regulasi tirosinase. MITF mengatur ekspresi berbagai gen dalam jalur melanogenesis, termasuk gen tirosinase (TYR). Aktivasi MITF oleh sinyal seperti α -MSH, ET-1, Wnt, atau sinar UV secara langsung meningkatkan transkripsi gen TYR sehingga sintesis enzim tirosinase meningkat dalam melanosit.

c. Hormon dan neuropeptida

Berperan penting dalam pengaturan tirosinase. Hormon seperti α -MSH, ACTH, estrogen, dan progesteron, serta neuropeptida seperti Substance P, dapat merangsang produksi tirosinase. Misalnya, α -MSH berikatan dengan reseptor MC1R pada melanosit dan mengaktifkan jalur cAMP/PKA yang kemudian meningkatkan ekspresi MITF dan tirosinase.

d. Proses inflamasi dan sitokin

Proses inflamasi dan sitokin lokal di kulit, seperti yang terjadi pada luka, jerawat, atau dermatitis, juga berpengaruh terhadap kadar tirosinase. Inflamasi ini memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α . Sitokin tersebut bisa memberikan efek stimulatif maupun inhibitor terhadap tirosinase tergantung pada konteksnya. Sebagai contoh, TNF- α cenderung menghambat ekspresi tirosinase, sementara IL-6 dapat meningkatkan melanogenesis dalam jangka panjang.

e. Stres oksidatif dan polusi lingkungan menjadi faktor penting lainnya.

Radikal bebas dari polusi udara, asap rokok, atau logam berat mengganggu homeostasis seluler dan menstimulasi jalur sinyal MAPK serta PI3K/AKT. Aktivasi jalur ini mendorong aktivasi MITF yang selanjutnya meningkatkan ekspresi tirosinase dan memperkuat pigmentasi kulit.³⁷

f. Faktor genetik juga sangat menentukan kadar tirosinase. Variasi genetik

pada gen TYR, MITF, atau MC1R dapat memengaruhi kadar tirosinase secara individual. Misalnya, mutasi gen TYR pada kondisi albinisme menyebabkan rendahnya aktivitas tirosinase, sementara beberapa

polimorfisme genetik justru meningkatkan aktivitasnya dan berkontribusi terhadap hiperpigmentasi.³⁷

- g. Suhu dan pH lingkungan sel dalam melanosit turut memengaruhi kestabilan dan aktivitas enzim tirosinase. pH yang terlalu asam atau suhu ekstrem dapat menurunkan aktivitas enzim ini, sedangkan kondisi fisiologis optimal (pH netral hingga sedikit basa dan suhu tubuh normal) mendukung peningkatan aktivitasnya.
- h. Asupan nutrisi dan mikronutrien, terutama ion tembaga (Cu^{2+}), sangat penting karena berfungsi sebagai kofaktor tirosinase. Kekurangan tembaga, vitamin C (yang juga berperan sebagai antioksidan dan penghambat tirosinase), atau asam amino tirosin sebagai substrat utama, dapat menyebabkan penurunan aktivitas tirosinase dan berkurangnya produksi melanin.
- i. Agen farmakologis dan bahan kosmetik seperti hidrokuinon, kojic acid, dan arbutin bekerja dengan cara menghambat aktivitas tirosinase secara langsung atau mengurangi ekspresi MITF. Oleh karena itu, bahan-bahan ini umum digunakan dalam terapi hiperpigmentasi, termasuk untuk mengatasi melasma dan flek hitam.¹

2.3. Hiperpigmentasi

2.3.1 Definisi

Hiperpigmentasi merupakan suatu kondisi kulit yang terjadi akibat produksi melanin berlebih oleh melanosit, sehingga menyebabkan warna kulit menjadi lebih gelap.³⁸ Melanin sendiri adalah pigmen yang menentukan warna

kulit manusia, dan diproduksi melalui proses melanogenesis dalam melanosom, yaitu organel khusus di dalam sel melanosit.³⁹

Melanin terdiri dari dua jenis utama, yaitu eumelanin yang memiliki warna hitam atau coklat dan pheomelanin yang berwarna kuning kemerahan. Pada kondisi hiperpigmentasi, kadar eumelanin cenderung lebih tinggi, terutama pada individu dengan kulit lebih gelap yang memiliki melanosom berukuran lebih besar dan jumlahnya lebih banyak dibandingkan individu dengan kulit lebih terang.³⁸ Hiperpigmentasi dapat terjadi di lapisan epidermis maupun dermis. Jika terjadi di epidermis, kondisi ini lebih mudah diatasi dengan agen pencerah kulit seperti hidrokuinon atau asam kojat, sedangkan hiperpigmentasi yang melibatkan lapisan dermis cenderung lebih sulit ditangani dan sering kali memerlukan terapi berbasis laser atau *chemical peel*.³⁹

Beberapa bentuk hiperpigmentasi yang umum ditemukan di antaranya melasma, hiperpigmentasi pasca-inflamasi (*post-inflammatory hyperpigmentation/PIH*), serta bintik penuaan atau *age spots*.⁴⁰ Melasma umumnya disebabkan oleh perubahan hormonal dan paparan sinar matahari, sehingga lebih sering dialami oleh perempuan yang sedang hamil atau menggunakan kontrasepsi hormonal.³⁸ Sementara itu, hiperpigmentasi pasca-inflamasi biasanya muncul sebagai respons kulit terhadap peradangan akibat jerawat, eksim, atau cedera kulit lainnya yang memicu produksi melanin secara berlebihan.⁴⁰

2.3.2. Faktor-faktor Penyebab Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi merupakan kondisi yang terjadi akibat peningkatan produksi melanin yang berlebihan di kulit, dipicu oleh berbagai faktor baik internal maupun eksternal. Faktor-faktor ini berperan dalam regulasi melanogenesis serta distribusi melanin dalam lapisan epidermis dan dermis.⁴¹

Berikut faktor-faktor penyebab terjadinya hiperpigmentasi:

1. Paparan UV

Paparan UV merupakan penyebab utama hiperpigmentasi karena merangsang produksi melanin sebagai respons terhadap stres oksidatif. Radiasi UV menginduksi pembentukan *reaktif oksigen spesies* (ROS), yang selanjutnya mengaktifkan jalur sinyal seperti *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan protein kinase C (PKC), meningkatkan aktivitas enzim tirosinase dalam melanosit.⁴² Akumulasi melanin yang dihasilkan akibat paparan UV yang berkepanjangan dapat menyebabkan munculnya bercak.⁴³

2. Stres Oksidatif

Stres oksidatif terjadi ketika produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan kulit, menyebabkan kerusakan sel dan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi yang menginduksi melanogenesis.⁴² Selain itu, ROS yang berlebihan dapat mengaktifasi jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin, yang telah terbukti meningkatkan produksi melanin dalam kondisi hiperpigmentasi.⁴³

3. Peradangan dan *Post-Inflammatory Hyperpigmentation* (PIH)

Post-Inflammatory Hyperpigmentation (PIH) terjadi sebagai respons terhadap peradangan akibat jerawat, eksim, psoriasis, atau cedera kulit

lainnya. Proses inflamasi menyebabkan pelepasan sitokin seperti *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), yang dapat mengaktivasi melanogenesis.⁴⁴ Selain itu, peradangan yang berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan pada membran basal epidermis, yang memungkinkan melanin masuk ke dermis dan menyebabkan hiperpigmentasi yang lebih sulit diatasi.⁴⁵

4. Faktor Hormonal

Perubahan kadar hormon, seperti selama kehamilan, penggunaan kontrasepsi oral, atau terapi hormon, dapat menyebabkan peningkatan aktivitas tirosinase dan produksi melanin.⁴¹ Estrogen dan progesteron diketahui dapat meningkatkan ekspresi faktor transkripsi *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), yang berperan penting dalam regulasi melanogenesis.⁴⁴ Akibat dari ketidakseimbangan hormonal ini maka rentan memicu terjadinya hiperpigmentasi.

5. Faktor Genetik

Predisposisi genetik juga berperan dalam munculnya hiperpigmentasi.⁴¹ Selain itu, etnisitas memengaruhi distribusi melanin dalam kulit, individu dengan kulit lebih gelap memiliki melanosom yang lebih besar dan lebih banyak, sehingga lebih rentan terhadap hiperpigmentasi pasca-inflamasi.⁴⁵

6. Paparan Polusi dan Radikal Bebas

Paparan polusi udara, termasuk partikel halus (PM2.5) dan gas reaktif seperti nitrogen oksida, dapat memperburuk hiperpigmentasi dengan

meningkatkan stres oksidatif dan peradangan kulit.⁴³ Partikel polusi dapat merangsang produksi ROS dan menginduksi ekspresi enzim tirosinase, sehingga mempercepat pembentukan melanin. Faktor lingkungan lainnya, seperti asap rokok dan bahan kimia dalam kosmetik, juga dapat berkontribusi terhadap peningkatan pigmentasi kulit.⁴²

7. Penggunaan Obat dan Zat Kimia

Beberapa jenis obat, seperti antibiotik tetrasiklin, obat antimalaria, dan obat kemoterapi, diketahui dapat menyebabkan hiperpigmentasi sebagai efek samping.⁴⁴ Selain itu, paparan bahan kimia seperti hidrokuinon dalam konsentrasi tinggi atau pemakaian jangka panjang dapat menyebabkan hiperpigmentasi paradoksial akibat toksisitas terhadap melanosit.⁴¹

8. Penuaan Kulit

Proses penuaan juga berkontribusi terhadap hiperpigmentasi. Dengan bertambahnya usia, terjadi akumulasi kerusakan DNA, disfungsi mitokondria, dan penurunan aktivitas enzim antioksidan yang menyebabkan peningkatan stres oksidatif dalam kulit.⁴¹ Penuaan juga dikaitkan dengan penurunan kemampuan kulit dalam memperbaiki kerusakan akibat radiasi UV, sehingga mempercepat pembentukan bercak hiperpigmentasi seperti lentigo senilis.⁴³

2.1.3 Peran UV-B dalam Meningkatkan Melanogenesis

Paparan ultraviolet B (UV-B) berperan penting dalam peningkatan produksi melanin di kulit melalui berbagai mekanisme molekuler yang melibatkan stres oksidatif, jalur pensinyalan seluler, dan interaksi antar sel kulit.

Radiasi UV-B memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), yang selanjutnya mengaktifkan jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Aktivasi jalur ini meningkatkan ekspresi *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), faktor utama yang mengontrol melanogenesis dengan mengatur ekspresi enzim tirosinase (TYR) serta protein terkait lainnya seperti *tyrosinase-related protein-1* (TRP-1) dan *tyrosinase-related protein-2* (TRP-2).⁴⁶

UV-B juga berpengaruh terhadap keratinosit, yang merupakan sel utama di epidermis, dengan merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti *interleukin-1 beta* (IL-1 β). Sitokin ini diketahui dapat meningkatkan ekspresi TYR dan TRP-1 dalam melanosit, yang pada akhirnya mempercepat proses produksi melanin.⁴⁷ Selain faktor inflamasi, eksosom yang dilepaskan oleh keratinosit setelah terpapar UV-B juga berperan dalam regulasi melanogenesis, karena mengandung mikroRNA (miRNA) yang dapat mengatur ekspresi gen penghasil melanin, baik dalam meningkatkan maupun menghambat produksinya.⁴⁶

Paparan UV-B juga meningkatkan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), yang mengaktifkan protein kinase A (PKA). Aktivasi PKA ini kemudian menstimulasi ekspresi MITF, yang memperkuat produksi tirosinase dan enzim terkait lainnya, sehingga mempercepat pembentukan melanin dalam melanosit.⁴⁸ Dalam jangka panjang, paparan UV-B yang berulang dapat menyebabkan hiperpigmentasi kronis, seperti yang terjadi pada melasma dan *post-inflammatory hyperpigmentation* (PIH). Hal ini disebabkan oleh akumulasi

ROS dan peningkatan ekspresi *stem cell factor* (SCF), yang mendorong proliferasi serta diferensiasi melanosit, sehingga memperparah hiperpigmentasi.⁴⁷

UV-B berperan signifikan dalam regulasi melanogenesis dengan menginduksi stres oksidatif, inflamasi, serta aktivasi jalur pensinyalan cAMP/MITF. Selain itu, keterlibatan keratinosit dalam pelepasan sitokin dan eksosom setelah paparan UV-B turut berkontribusi terhadap peningkatan produksi melanin.⁴⁹

2.4. Mulberry (*Morus alba* L.)

2.4.1. Klasifikasi dan Karakteristik

Mulberry (*Morus alba* L.) merupakan spesies dari genus *Morus* dalam famili Moraceae. Tanaman ini berasal dari Tiongkok dan telah tersebar luas ke berbagai wilayah dengan iklim tropis, subtropis, dan sedang, termasuk Asia, Eropa, Amerika Utara, serta Afrika. Berikut merupakan klasifikasinya:⁵⁰⁻⁵²

Kingdom: *Plantae*

Divisi: *Magnoliophyta* (*Angiospermae*)

Kelas: *Magnoliopsida* (*Dicotyledonae*)

Ordo: *Rosales*

Famili: *Moraceae*

Genus: *Morus*

Spesies: *Morus alba* L.

Morus alba adalah pohon gugur dengan tinggi yang bervariasi antara 5 hingga 20 meter. Daunnya memiliki bentuk yang beragam, mulai dari lonjong

hingga menjari, dan berwarna hijau terang. Bagian daun ini sering digunakan sebagai pakan ulat sutra serta memiliki nilai farmakologis yang signifikan.⁵¹ Buahnya berbentuk silindris dengan warna putih hingga ungu kehitaman saat matang, tergantung pada kultivar dan lingkungan pertumbuhannya (Gambar 2.1)

Bagian-bagian mulberry, termasuk daun, akar, kulit batang, dan buahnya, mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, dan antosianin. Senyawa-senyawa ini memiliki berbagai manfaat kesehatan, termasuk aktivitas antioksidan, antiinflamasi, dan pencerah kulit, sehingga sering dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan kosmetik. Flavonoid utama dalam tanaman ini meliputi quercetin, rutin, dan apigenin, sementara kandungan asam fenoliknya mencakup asam ferulat, asam klorogenat, dan asam protokatekuat. Senyawa ini memberikan efek antioksidan, antiinflamasi, antihiperglikemik, serta berkontribusi dalam regulasi melanogenesis dan pencerahan kulit.⁵³

Ekstrak akar dan kulit batang mulberry diketahui memiliki sifat penghambat enzim tirosinase, yang berperan dalam biosintesis melanin. Studi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari kulit akar mulberry memiliki aktivitas penghambatan tirosinase dengan IC_{50} sebesar 12,68 $\mu\text{g/mL}$, lebih efektif dibandingkan dengan kontrol positif asam kojat.⁵⁰ Selain itu, kandungan oksiresveratrol dalam cabang mulberry telah terbukti membantu mengatasi hiperpigmentasi pasca-inflamasi melalui mekanisme anti-melanogenesis, inhibisi transfer melanosom, dan perlindungan terhadap sinar UV.⁵⁴

2.4.2. Kandungan Senyawa Bioaktif Mulberry

Mulberry selain digunakan dalam kosmetik, mulberry juga memiliki potensi sebagai bahan pangan fungsional karena kaya akan serat, vitamin C, dan mineral seperti kalsium, kalium, serta magnesium.⁵² Daun dan buahnya sering dikonsumsi dalam bentuk teh, suplemen makanan, serta diolah menjadi berbagai produk kesehatan untuk pengelolaan diabetes dan penyakit metabolik lainnya.⁵¹

Mulberry (*Morus alba* L.) merupakan tanaman yang kaya akan berbagai senyawa bioaktif dengan manfaat farmakologis yang luas. Komponen utama dalam mulberry terdiri dari flavonoid, stilbenoid, alkaloid, dan berbagai senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, serta berperan dalam regulasi melanogenesis. Flavonoid seperti kuersetin, rutin, morin, dan kaempferol ditemukan dalam jumlah tinggi di daun dan kulit akar tanaman ini. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan menangkap radikal bebas serta menghambat peroksidasi lipid, yang pada akhirnya melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. Selain itu, flavonoid dalam mulberry juga berkontribusi terhadap penghambatan tirosinase, enzim kunci dalam produksi melanin, sehingga berperan dalam terapi pencerah kulit dan pengelolaan hiperpigmentasi.⁵¹

Mulberry mengandung stilbenoid seperti mulberrosida A, yang terbukti secara in vitro mampu menghambat aktivitas tirosinase lebih kuat dibandingkan dengan asam kojat. Selain itu, flavonoid dalam mulberry juga berperan sebagai agen antioksidan dan pencerah kulit, membuatnya efektif dalam produk perawatan kulit untuk mengatasi hiperpigmentasi. Mekanisme ini menjadikan

mulberrosida A sebagai agen pencerah kulit yang potensial. Senyawa stilbenoid lainnya, seperti oksiresveratrol, juga menunjukkan aktivitas depigmentasi yang kuat dengan cara menghambat produksi melanin serta memiliki sifat antiinflamasi yang dapat membantu mengatasi hiperpigmentasi pasca-inflamasi.⁵⁵ Mulberry mengandung alkaloid seperti 1-*deoxynojirimycin* (DNJ), yang memiliki efek antidiabetes dengan cara menghambat enzim α -glukosidase, sehingga membantu mengontrol kadar glukosa dalam darah. Efek ini menunjukkan bahwa tanaman ini tidak hanya bermanfaat dalam perawatan kulit, tetapi juga berpotensi dalam terapi diabetes dan gangguan metabolik lainnya.⁵⁶

Senyawa fenolik yang ditemukan dalam mulberry, seperti asam klorogenat, asam ferulat, dan asam protokatekuat, juga memberikan manfaat kesehatan yang signifikan. Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, membantu mengurangi stres oksidatif pada kulit, serta berperan dalam mempercepat regenerasi kulit dan mengurangi peradangan. Selain itu, kandungan fenolik dalam tanaman ini juga diketahui dapat meningkatkan mekanisme pertahanan alami tubuh terhadap kerusakan akibat sinar UV, yang berkontribusi dalam perlindungan terhadap hiperpigmentasi dan penuaan kulit akibat paparan lingkungan.⁵⁷ Ekstrak mulberry memiliki potensi besar dalam berbagai aplikasi, termasuk dalam formulasi produk kosmetik untuk pencerahan kulit serta sebagai terapi alami dalam perawatan hiperpigmentasi.⁵⁶

2.4.3. Efektivitas Mulberry (*Morus alba* L.) sebagai Inhibitor Tirosinase

Mulberry (*Morus alba* L.) telah banyak diteliti karena kemampuannya dalam menghambat aktivitas tirosinase, enzim utama yang berperan dalam

biosintesis melanin. Tirosinase mengkatalisis konversi tirosin menjadi dopaquinone, yang kemudian berlanjut ke tahap pembentukan melanin. Inhibitor tirosinase berperan dalam mencegah hiperpigmentasi berlebih yang disebabkan oleh produksi melanin yang tidak terkontrol.⁵⁵

Beberapa studi menunjukkan bahwa ekstrak akar dan kulit batang Mulberry mengandung senyawa bioaktif seperti mulberrosida A, oksiresveratrol, dan flavonoid yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase yang signifikan. Mulberrosida A telah terbukti secara *in vitro* memiliki kemampuan menghambat tirosinase dengan mekanisme kompetitif, menghambat pengikatan substrat tirosin terhadap enzim dan secara langsung menurunkan produksi melanin.⁵⁵ Studi lainnya juga menunjukkan bahwa oksiresveratrol, yang terkandung dalam ekstrak mulberry memiliki aktivitas inhibisi tirosinase yang lebih kuat dibandingkan dengan asam kojat, yang selama ini menjadi standar dalam terapi pencerah kulit.⁵⁸

Fenolik seperti asam klorogenat dan flavonoid seperti kuersetin serta rutin yang terdapat dalam daun dan kulit batang mulberry (*Morus alba* L.) berkontribusi dalam menghambat aktivitas tirosinase. Senyawa ini bekerja dengan cara mengikat langsung situs aktif tirosinase, sehingga menghambat aktivitas enzim dan menurunkan produksi melanin secara keseluruhan.⁵⁷ Studi menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak mulberry dengan agen pencerah kulit lainnya dapat meningkatkan efektivitas depigmentasi dengan cara memperlambat transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit, sehingga memberikan efek pencerahan kulit yang lebih optimal.⁵¹

Senyawa aktif dari mulberry dalam studi kinetik menunjukkan efek penghambatan tirosinase melalui pola inhibisi kompetitif dan non-kompetitif, bergantung pada struktur molekulnya. Mulberrosida A berperan sebagai inhibitor kompetitif dengan berinteraksi langsung dengan tirosinase, sedangkan oksiresveratrol bekerja melalui mekanisme inhibisi campuran dengan mempengaruhi konformasi enzim.⁵⁵ Selain itu, beberapa senyawa dari mulberry juga memiliki kemampuan antioksidan yang dapat mengurangi stres oksidatif pada sel kulit, sehingga turut berperan dalam pencegahan hiperpigmentasi akibat peradangan dan paparan UV.⁵⁸

2.5. Hewan Uji Mencit C57BL/6

2.5.1. Karakteristik

Mencit C57BL/6 merupakan salah satu strain mencit yang paling banyak digunakan dalam penelitian biomedis, terutama dalam studi genetika, imunologi, dan fisiologi penyakit. Strain ini berasal dari *inbreeding* jangka panjang yang dilakukan sejak tahun 1921 dan telah menghasilkan mencit dengan latar belakang genetik yang homogen, menjadikannya model hewan yang sangat andal dalam berbagai eksperimen.⁵⁹

Mencit C57BL/6 dikenal memiliki daya tahan yang tinggi terhadap berbagai kondisi eksperimental dan memiliki respons imun yang relatif kuat, sehingga sering digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan inflamasi, metabolisme, serta model penyakit seperti diabetes dan kanker.⁶⁰ Selain itu, mencit C57BL/6 memiliki karakteristik kulit yang relatif lebih tipis dibandingkan dengan strain lain, sehingga sangat sesuai untuk penelitian yang

berkaitan dengan penyembuhan luka dan evaluasi efektivitas bahan aktif dalam terapi luka kulit.⁵⁹

Dalam studi farmakologi dan toksikologi, strain ini menunjukkan metabolisme obat yang lebih cepat dibandingkan strain mencit lainnya, yang membuatnya menjadi pilihan utama dalam pengujian keamanan dan efektivitas berbagai senyawa farmasi. Selain itu, mencit C57BL/6 juga memiliki kecenderungan alami untuk mengalami obesitas dan resistensi insulin ketika diberi diet tinggi lemak, menjadikannya model yang ideal untuk penelitian terkait obesitas dan diabetes mellitus.⁶⁰

Karakteristik fisiologis lainnya yang menonjol dari mencit C57BL/6 termasuk responsnya yang lebih sensitif terhadap radiasi UV dibandingkan strain lain, yang dapat dimanfaatkan dalam studi mengenai efek sinar UV terhadap melanogenesis dan hiperpigmentasi kulit. Strain ini juga menunjukkan perbedaan dalam tingkat ekspresi enzim antioksidan dan respons terhadap stres oksidatif, yang dapat berkontribusi dalam studi inflamasi dan proses penuaan kulit.⁵⁹

2.5.2 Induksi Hiperpigmentasi

Paparan UV-B telah diketahui secara luas sebagai faktor utama dalam meningkatkan proses melanogenesis yang mengarah pada hiperpigmentasi. Radiasi UV-B memiliki panjang gelombang 280–320 nm dan menembus lapisan epidermis, menyebabkan stres oksidatif yang memicu aktivasi berbagai jalur sinyal seluler, termasuk jalur inflamasi dan produksi melanin di melanosit.⁶¹

Dalam model hewan uji, terutama mencit C57BL/6, paparan UV-B digunakan untuk menginduksi hiperpigmentasi guna meneliti mekanisme regulasi melanogenesis serta efektivitas agen depigmentasi. Studi menunjukkan bahwa paparan UV-B dapat meningkatkan ekspresi enzim tirosinase, yang merupakan enzim utama dalam biosintesis melanin, melalui peningkatan aktivitas *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). MITF bertanggung jawab dalam regulasi ekspresi gen tirosinase, *tirosinase-related protein 1* (TRP-1), dan TRP-2, yang berperan dalam produksi melanin.⁶¹

Paparan UV-B juga berkontribusi terhadap peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dalam sel epidermis, yang selanjutnya dapat menginduksi inflamasi dan memicu produksi sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) dan Interleukin-1 β (IL-1 β). Sitokin ini diketahui memiliki peran dalam stimulasi melanosit untuk meningkatkan produksi melanin sebagai mekanisme perlindungan terhadap kerusakan DNA akibat radiasi UV-B.⁶²

Peningkatan produksi melanin pada mencit yang terpapar UV-B, terjadi juga peningkatan tebal epidermis akibat hiperproliferasi keratinosit sebagai respons terhadap kerusakan kulit. Hal ini menunjukkan bahwa efek dari radiasi UV-B tidak hanya menyebabkan perubahan warna kulit tetapi juga perubahan struktural pada jaringan kulit.⁶³

2.5.3 Kelebihan Model Hewan Uji Mencit C57BL/6

Mencit C57BL/6 sering digunakan sebagai model hewan uji in vivo dalam penelitian hiperpigmentasi karena memiliki karakteristik genetik yang seragam

dan respons imun yang stabil, yang menjadikannya model yang dapat diandalkan untuk mengevaluasi efek berbagai agen terapeutik terhadap proses pigmentasi kulit. Selain itu, mencit ini memiliki kulit yang lebih gelap dibandingkan dengan strain lainnya, yang memungkinkan pengamatan lebih jelas terhadap perubahan pigmentasi akibat paparan faktor eksternal seperti radiasi UV-B.⁶⁴

Keunggulan lain dari mencit C57BL/6 adalah kecenderungannya untuk mengembangkan respons inflamasi yang dapat dimanfaatkan dalam studi hiperpigmentasi akibat peradangan. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa paparan UV-B pada mencit C57BL/6 dapat menginduksi peningkatan ekspresi enzim tirosinase serta protein terkait tirosinase (TRP-1 dan TRP-2), yang berperan dalam biosintesis melanin.⁶⁵ Selain itu, mencit ini menunjukkan ekspresi melanosit yang tinggi di lapisan basal epidermis, memungkinkan analisis lebih mendalam terkait mekanisme pigmentasi yang dimediasi oleh stres oksidatif dan peradangan.⁶⁶

Mencit C57BL/6 pada model hiperpigmentasi yang diinduksi oleh UV-B menunjukkan peningkatan ekspresi mediator inflamasi seperti *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) dan *interleukin-6* (IL-6). Kondisi ini dapat mempercepat aktivasi jalur sinyal yang terkait dengan melanogenesis.⁴¹ Model mencit ini sangat berguna dalam mengevaluasi efektivitas agen depigmentasi serta memahami mekanisme molekuler yang terlibat dalam regulasi pigmentasi kulit.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan ultraviolet B (UV-B) yang berlebihan dapat memicu terjadinya stres oksidatif pada kulit melalui peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), aktivasi jalur inflamasi, dan kerusakan DNA. ROS merupakan respons awal sel terhadap paparan UV-B dan berperan penting dalam merusak struktur seluler, termasuk lipid, protein, dan asam nukleat. Akumulasi ROS memicu pelepasan berbagai mediator inflamasi, serta merangsang keratinosit untuk mensintesis dan melepaskan endotelin-1 (ET-1). ET-1 merupakan peptida vasoaktif yang berperan signifikan dalam proses pigmentasi dan inflamasi kulit. Molekul ini berikatan dengan reseptor endotelin B (ENDBR) pada melanosit, yang selanjutnya mengaktifkan mobilisasi ion kalsium intraseluler (Ca^{2+}) dan protein kinase C (PKC). Aktivasi ini menyebabkan fosforilasi ERK1/2, serta peningkatan aktivitas JNK dan p38, dua jalur pensinyalan utama yang juga diinduksi oleh UV-B.¹⁸

Jalur pensinyalan dari reseptor *melanocortin 1 receptor* (MC1R) dan ENDBR berintegrasi pada titik aktivasi faktor transkripsi *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) dan p53. Aktivasi kedua faktor ini berperan dalam meningkatkan kelangsungan hidup melanosit, merangsang produksi melanin (pigmentasi), memperkuat respons antioksidan, serta mendukung perbaikan kerusakan DNA akibat UV-B. Selain itu, ET-1 juga

berkontribusi terhadap peningkatan vaskularisasi melalui efek vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, yang dapat memperkuat respons inflamasi lokal. Secara kronologis, produksi ROS terjadi lebih awal sebagai respons langsung terhadap paparan UV-B, sedangkan pelepasan ET-1 oleh keratinosit merupakan respon sekunder yang memperkuat proses pigmentasi dan inflamasi pada kulit.¹⁸

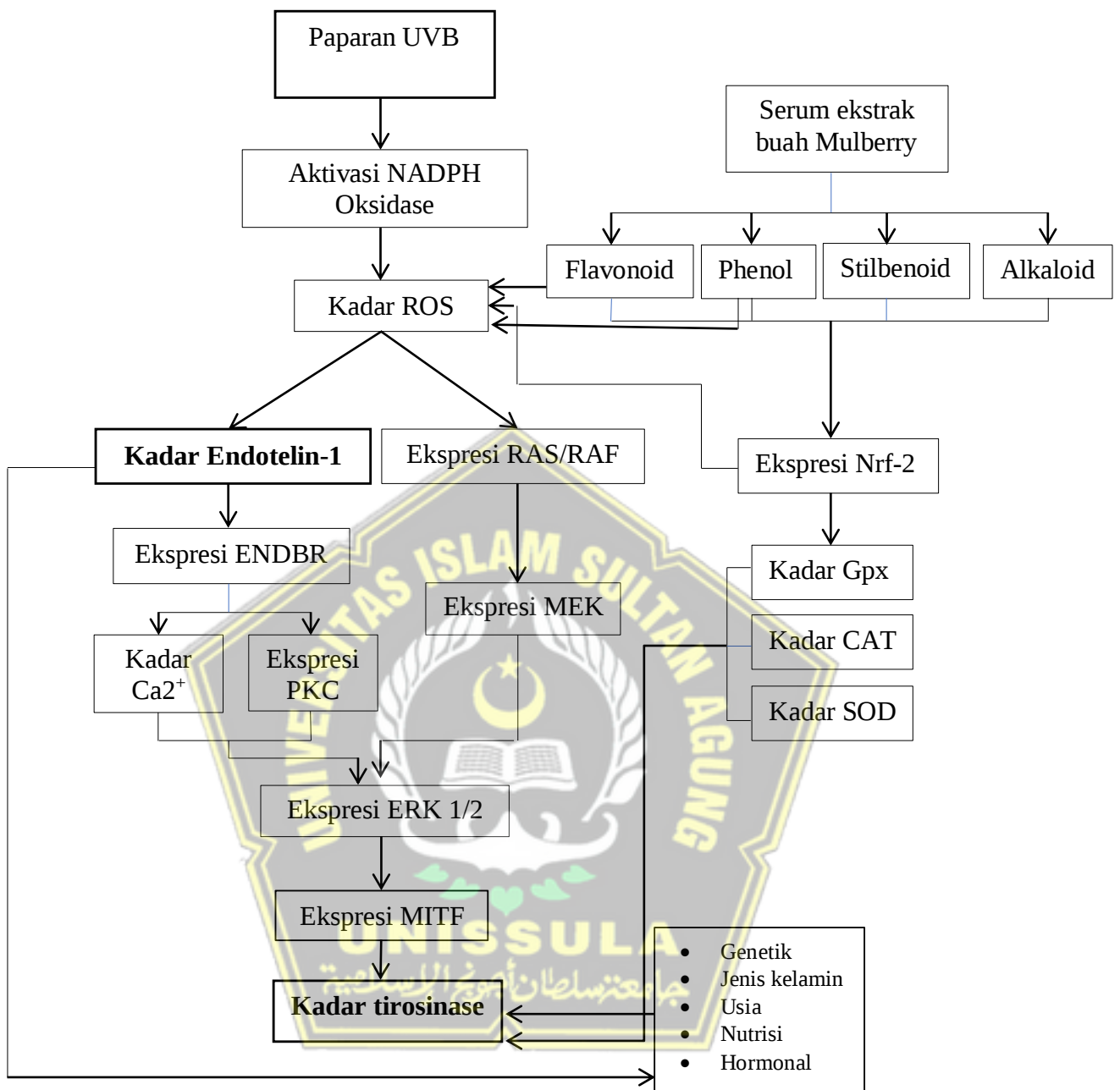
UV-B menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi yang berperan dalam respons inflamasi jaringan kulit dan memicu peningkatan ekspresi tirosinase, enzim utama dalam proses melanogenesis. Aktivitas tirosinase yang berlebihan menyebabkan peningkatan produksi dan akumulasi melanin, yang pada akhirnya berkontribusi terhadap perkembangan hiperpigmentasi pada kulit.^{67,68}

Ekstrak mulberry (*Morus alba* L.) berpotensi sebagai agen depigmentasi melalui mekanisme antioksidan, antiinflamasi, dan penghambatan tirosinase. Kandungan bioaktif seperti flavonoid dan polifenol dalam mulberry mampu menekan produksi ROS yang dihasilkan akibat paparan UV-B, sehingga dapat mengurangi stres oksidatif yang menjadi pemicu utama aktivasi tirosinase.⁶⁹ Selain itu, senyawa aktif dalam Mulberry, seperti morusin dan kuwanon C, telah terbukti secara signifikan menghambat tirosinase dan menekan ekspresi gen yang terlibat dalam melanogenesis, termasuk *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), *tirosinase-related protein 1* (Trp-1), dan *tirosinase-related protein 2* (Trp-2).⁷⁰

Paparan UV-B yang berulang pada mencit C57BL/6 diketahui menyebabkan peningkatan produksi ET-1 dan akumulasi melanin pada

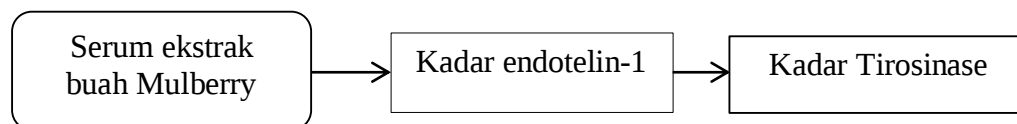
epidermis. Namun, pemberian ekstrak mulberry terbukti dapat mengurangi hiperpigmentasi secara signifikan dengan menekan jalur inflamasi dan menghambat aktivitas tirosinase melalui regulasi jalur sinyal MITF-TYR.⁷¹





Gambar 3.1 Alur Kerangka teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka konsep

3.3. Hipotesis

Pemberian serum ekstrak mulberry (*Morus alba*) berpengaruh terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada mencit C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.

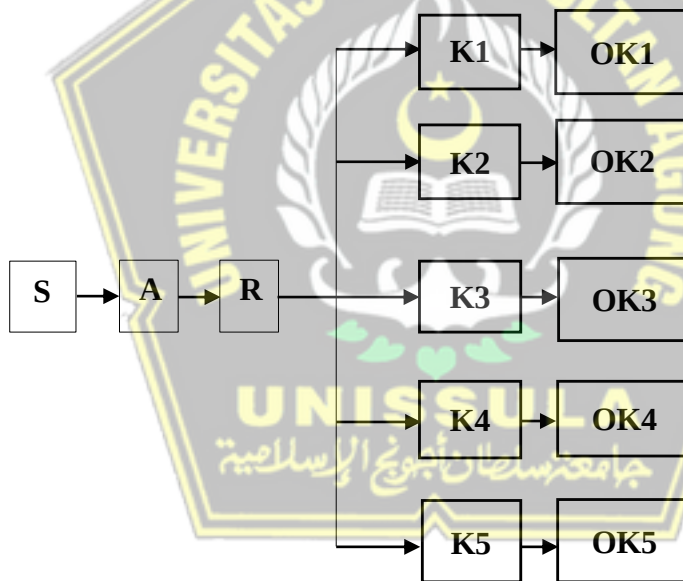


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design* menggunakan hewan uji mencit strain C57BL/6 yang diinduksi hiperpigmentasi akibat paparan UV-B (Gambar 4.1)



Gambar 4.1 Alur Rancangan penelitian

Keterangan:

- S : Sampel Penelitian (Mencit C57BL/6)
- A : Adaptasi
- R : Randomisasi

- K1 : Kelompok mencit sehat
- K2 : Kontrol Negatif (Mencit dengan diinduksi paparan UV-B tanpa perlakuan)
- K3 : Kontrol Positif (Mencit dengan diinduksi paparan UV-B diberikan hidrokuinon dengan konsentrasi 2% secara topikal)
- K4 : Mencit diinduksi paparan UV-B, kemudian diberikan serum ekstrak mulberry dengan konsentrasi 5% secara topikal.
- K5 : Mencit diinduksi paparan UV-B, kemudian diberikan serum ekstrak mulberry dengan konsentrasi 10% secara topikal.
- O : Observasi pengukuran parameter penelitian kadar endotheline-1 dan tirosinase pada masing-masing kelompok perlakuan

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini konsentrasi serum ekstrak mulberry secara topikal

4.2.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar tirosinase dan

endothelin-1

4.2.2 Definisi Operasional

4.2.2.1 Konsentrasi Serum Ekstrak Mulberry

Serum ekstrak mulberry diformulasikan dari ekstrak buah mulberry menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Konsentrasi ekstrak buah mulberry dengan formula serum yaitu 5 % dan 10%. Serum diaplikasikan secara topikal dibagian punggung mencit sebanyak 0,5 g 1 kali sehari selama 5 hari.

Unit :%

Skala : Nominal

4.2.2.2 Kadar endotelin-1

Kadar endotelin-1 dianalisis dari jaringan kulit mencit menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pengukuran dilakukan pada hari ke 27 setelah pemberian perlakuan.

Unit : ng/L

Skala : Rasio

4.2.2.3 Kadar tirosinase

Kadar tirosinase dianalisis dari jaringan kulit mencit menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pengukuran dilakukan pada hari ke 27 setelah pemberian perlakuan.

Unit : $\mu\text{mol/L}$

Skala : Rasio

4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subjek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah mencit jantan C57BL/6 yang diperoleh dari Laboratorium Kemuning Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mencit C57BL/6 jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

a. Kriteria Inklusi

1. Umur 7-8 minggu
2. Mencit sehat dan aktif selama masa adaptasi
3. Berat badan 20-25 gram.

b. Kriteria Eksklusi

1. Mencit yang memiliki luka, iritasi atau kelainan kulit pada area yang diberikan perlakuan.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya
3. Mencit yang menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit atau stress selama masa adaptasi

c. Kriteria Drop Out

Kriteria drop out pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mencit yang mati selama periode perlakuan
2. Mencit yang menunjukkan kondisi kesehatan yang memburuk secara signifikan selama penelitian, seperti tanda-tanda infeksi, stress berat, atau gangguan fisik lainnya dengan perlakuan, sehingga mempengaruhi validasi hasil penelitian.
3. Mencit yang mengalami cedera atau kerusakan kulit yang tidak berhubungan dengan perlakuan yang diberikan sehingga mempengaruhi validasi hasil penelitian.

4.4 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Metode pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan *randomized sampling*. Mencit C57BL/6 dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok mencit sehat, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok pemberian serum ekstrak mulberry 5%, dan kelompok pemberian serum ekstrak mulberry 10%. Jumlah keseluruhan sampai mencit yang digunakan dalam penelitian yaitu sebanyak 34 ekor.

4.5 Besar sampel

Total jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ditentukan menggunakan rumus Federer,⁷² sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 (t-1)(n-1) &\geq 15 \\
 (5-1)(n-1) &\geq 15 \\
 4n - 5 &\geq 15 \\
 n &\geq (15+4)/4 \\
 n &\geq 4,75 \\
 n &\geq \approx 5
 \end{aligned}$$

Keterangan: t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan.

Hasil perhitungan diperoleh jumlah sampel sebanyak 5 ekor untuk tiap kelompok. jumlah sampel yang diperlukan adalah 25 ekor Mencit jantan C57BL/6. Sampel ditambah 1 ekor sebagai cadangan pada setiap kelompok untuk menghindari adanya *drop out* seperti sakit atau mati. Pada setiap kelompok ditambahkan 1 ekor mencit sebagai cadangan jika saat perlakuan ada subjek yang *drop out*, sehingga total sampel menjadi 34 ekor Mencit C57BL/6.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain:

1. Alat tulis laboratorium (label, marker)
2. Animal handling gloves
3. Ayakan ukuran 20 mesh
4. Beaker glass
5. Blender
6. Botol berwarna gelap
7. Centrifuge
8. Corong
9. ELISA reader
10. Gelas ukur
11. Homogenizer elektrik

12. Hot plate
13. Kertas saring
14. Lampu UV-B (302 nm)
15. Magnetic stirrer
16. Mesin pencukur bulu
17. Mikrocentrifuge
18. Moisture balance
19. Mortar dan pestle
20. pH meter
21. Pisau
22. Pisau bedah
23. Rotary evaporator
24. Spatula
25. Timbangan analitik
26. Timer
27. Vortex mixer
28. Dermoskop riester ri-scope ri-derma

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain:

1. Mencit jantan galur C57BL/6

2. Ethanol 70%
3. Tween 80
4. Glycerin
5. Methyl paraben
6. Propyl paraben
7. Aquadest
8. Nitrogen cair
9. Buffer lisis dingin (RIPA buffer)
10. Protease inhibitor
11. Kit ELISA (Endotelin-1 dan Tirosinase)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengajuan perizinan Ethical Clearance

Penelitian terhadap hewan percobaan dilakukan setelah mendapatkan *ethical clearance* dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang (Lampiran 1).

4.7.2 Persiapan sampel

Mencit C57BL/6 sebanyak 34 ekor disiapkan di Laboratorium IBL Unissula. Pada kelompok perlakuan, area terpapar UV-B diberikan serum ekstrak mulberry dan hidrokuinin 2% sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan. Kemudian mencit diadaptasi selama 7 hari di lingkungan yang telah disiapkan, dan diberikan pakan dan air secara *ad libitum*.

4.7.3 Persiapan Bahan Sediaan Ekstrak Dann Serum Buah Mulberry (*Morus alba*) dan Hidrokuinon

Bahan uji utama yang digunakan adalah ekstrak bubuk buah mulberry (*Morus alba*) dan serum ekstrak mulberry 10%. Ekstrak bubuk mulberry diperoleh dari PT Inbi Nusantara Sejahtera, Bali, Indonesia, dengan spesifikasi berbentuk bubuk berwarna krem, beraroma khas mulberry, larut dalam air, kadar air 7,75%, pH larutan 10% sebesar 6,79, serta memenuhi persyaratan mikrobiologi (Total Plate Count $< 1 \times 10^2$ koloni/g, *Yeast and Moulds* $< 1 \times 10^1$ koloni/g, dan negatif terhadap *Coliform*, *E. coli*, serta *Salmonella*). Produk memiliki masa simpan 12 bulan pada suhu 20–32 °C dan tersertifikasi halal MUI, ISO 9001, serta ISO 22000.

Serum ekstrak mulberry 10% diperoleh dari PT Derma Elok Farma, Indonesia, berbentuk cairan kental berwarna kecoklatan, pH 5,12, viskositas 560 cps, dan densitas 1,041 g/ml, serta memenuhi parameter mikrobiologi internal yang aman digunakan. Hidrokuinon 2% digunakan sebagai pembanding (*gold standard* terapi hiperpigmentasi), diperoleh dari sumber komersial sesuai standar farmakope dalam bentuk sediaan topikal.

4.7.4 Prosedur induksi hiperpigmentasi dengan paparan UV-B

Prosedur induksi paparan UV-B pada model hiperpigmentasi selama 14 hari pada mencit jantan galur C57BL/6 dimulai dengan tahap adaptasi selama 7 hari di laboratorium hewan coba. Mencit dipelihara dalam

kandang dengan suhu 24-26°C dan kelembaban terkontrol serta diberikan pakan dan air minum ad libitum. Sebelum diberikan paparan UV-B, dilakukan pencukuran bulu pada bagian dorsal (punggung) menggunakan mesin pencukur rambut hewan merk T9 *Hair Trimmer Dragon Design* hingga terbuka area dengan diameter sekitar 3 cm agar UV-B dapat langsung mengenai kulit. Mencit kemudian ditempatkan pada wadah khusus yang memungkinkan paparan merata, lalu diberikan paparan UV-B. Paparan UV-B sebesar 180 mJ/cm² pada jarak 10 cm dengan panjang gelombang 302 nm selama 10 menit/hari. Perlakuan paparan UV-B dilakukan selama 3 hari seminggu selama 2 minggu yang diketahui efektif dalam memicu kerusakan kulit termasuk hiperpigmentasi.⁷³ Selama periode perlakuan, kondisi kulit mencit diamati untuk mendeteksi kemungkinan iritasi atau efek samping lainnya (lampiran 5 dan 7), serta memastikan tidak ada stres berlebih akibat paparan UV-B.

4.7.6 Penetapan Dosis

Penentuan dosis topikal ekstrak buah mulberry dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa ekstrak buah mulberry konsentrasi 5% untuk penggunaan topikal menunjukkan hasil yang efektif dan stabil dalam menurunkan pigmentasi yang disebabkan oleh paparan sinar UV dan PIH.⁷⁴ Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan konsentrasi ekstrak buah mulberry 5% dan 10 % untuk melihat perbedaan efektivitas ekstrak mulberry pada hiperpigmentasi kulit mencit.

4.7.5 Pengambilan sampel jaringan kulit Mencit

Jaringan kulit pada area paparan UV-B diambil pada hari ke-27 setelah paparan UV-B selama 14 hari dan setelahnya diberikan perlakuan selama 5 hari, dengan prosedur sebagai berikut:

- a) Mencit diterminasi dengan metode euthanasia menggunakan klorofom
- b) Jaringan kulit diambil pada bagian kulit yang dipapar UV-B dengan metode biopsi.
- c) Potongan jaringan diambil dengan hati-hati untuk menjaga struktur dan morfologinya.

4.7.6 Prosedur preparasi jaringan kulit mencit sebelum analisis metode ELISA

Prosedur preparasi jaringan sebelum analisis ELISA sebagai berikut:

- a) Homogenisasi jaringan dengan menyiapkan buffer lisis dingin *Radio-Immuno Precipitation Assay buffer* (RIPA buffer) dengan menambahkan protease inhibitor sesuai dosis rekomendasi produsen.
- b) Jaringan dipotong menjadi potongan kecil (1–2 mm) dengan gunting steril untuk mempermudah homogenisasi.
- c) Potongan jaringan dimasukkan ke dalam tabung *mikrocentrifuge* yang berisi 500–1000 μ L buffer lisis dingin.
- d) Homogenisasi jaringan dengan homogenizer elektrik dengan kecepatan sedang hingga jaringan menjadi halus.
- e) Homogenat jaringan dinkubasi pada suhu 4°C selama 30–60 menit

dengan pengocokan berkala (vortex setiap 10 menit).

f) Homogenat disentrifuse pada 12.000–14.000 rpm selama 15–20 menit pada suhu 4°C.

- Supernatan diambil menggunakan pipet steril secara hati-hati, agar tidak bercampur dengan debris atau pelet.
- Supernatan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge baru, kemudian

diman supernatan di freezer (-80°C) sampai dianalisis menggunakan ELISA.

4.7.7 Prosedur Analisis kadar endotelin-1 dan tirosinase dengan metode ELISA

Supernatan yang sudah diperoleh kemudian dianalisis kadar enzim *tirosinase* menggunakan metode ELISA, mengikuti prosedur yang dilampirkan dalam produk, menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang 450 nm. Tahapan pemeriksaanya sebagai berikut:

1. Pembuatan standard
 - a) Sepuluh sumuran pada mikroplate disiapkan.
 - b) Pada sumuran 1 dan 2, sebanyak 100 µL cairan standar dan 50 µL diluent standar ditambahkan, kemudian dicampurkan secara merata.
 - c) Sebanyak 100 µL cairan dari sumuran 1 dan 2 diambil dan ditambahkan ke sumuran 3 dan 4 bersama dengan 50 µL diluent standar, kemudian dicampurkan.

- d) Sebanyak 100 μ L cairan dari sumuran 3 dan 4 ditambahkan ke sumuran 5 dan 6 bersama dengan 50 μ L diluent standar, kemudian dicampurkan hingga homogen.
 - e) Pada sumuran 7 dan 8, sebanyak 100 μ L cairan dari sumuran 5 dan 6 dan 50 μ L diluent standar ditambahkan, lalu dicampurkan secara merata.
2. Antibodi ditambahkan dan inkubasi dilakukan selama tiga puluh menit pada suhu 37°C. Larutan pencuci dicampurkan dengan aquadest sebanyak tiga puluh kali, kemudian sumuran dicuci sebanyak lima kali menggunakan larutan pencuci yang telah disiapkan pada tahap sebelumnya.
 3. Buffer penghalang ditambahkan untuk memastikan antigen menempel pada plat, dan inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu 37°C atau semalam pada suhu 4°C.
 4. Sampel sebanyak 100 μ L dimasukkan ke tiap sumuran dan diinkubasi selama 120 menit pada suhu ruangan.
 5. Sebanyak 100 μ L antibodi yang telah dibiotinilasi (biotinylated antibody) ditambahkan ke tiap sumuran.
 6. Plate kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C atau semalam pada suhu 4°C. Larutan kemudian dibuang, sumuran dicuci sebanyak lima kali, dan 100 μ L larutan ABC ditambahkan ke setiap sumuran lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

7. Sebanyak 100 μ L HRP-conjugate dan 100 μ L substrat TMB ditambahkan ke tiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
8. Sebanyak 100 μ L stop solution ditambahkan ke tiap sumuran hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning.
9. Nilai absorbansi (OD/Optical Density) dibaca menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm, dan hasil kadar endotelin-1 serta tirosinase diperoleh dari pembacaan tersebut.

4.8 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian hewan coba dilakukan di *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan analisis kadar endotelin-1 dan tirosinase metode ELISA dilakukan di Laboratorium CITO Jogjakarta, pelaksanaan dilakukan pada bulan Juni-Juli 2025 (Lampiran 2).

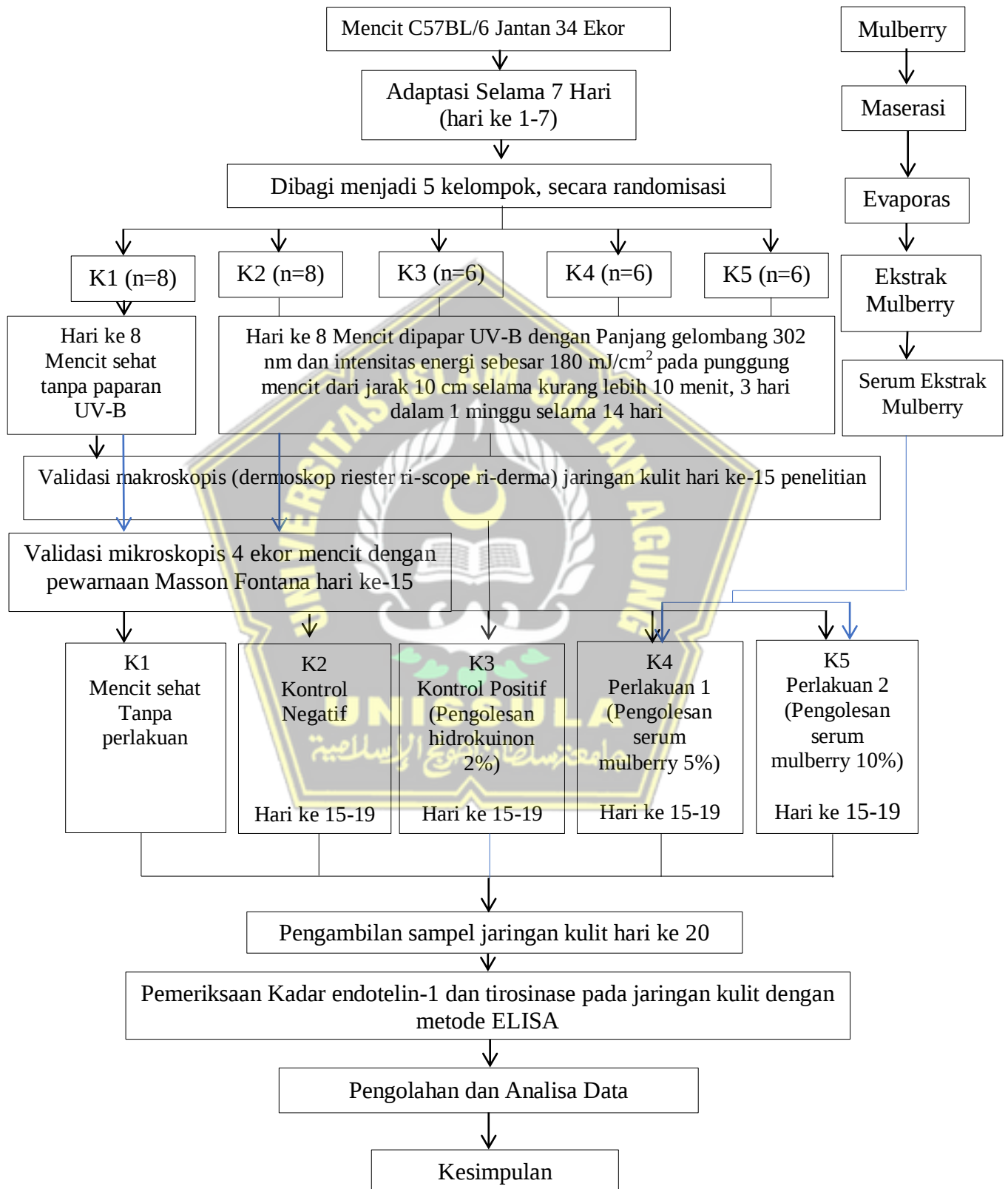
4.9 Analisa Data

Data kadar endholein-1 dan tirosinase dari total 25 ekor mencit (5 ekor per kelompok) dianalisis menggunakan uji statistik deskriptif, yang kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varian data menggunakan *Levene test*. Data kadar endotelin-1 menunjukkan distribusi data tidak normal ($p > 0,05$), sehingga dilakukan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data kadar tirosinase terdistribusi normal dan varian data

homogen ($P > 0,05$), sehingga dilakukan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* tidak signifikan sehingga tidak dilanjutkan dengan dengan uji *Post hoc LSD*. Keputusan untuk menerima atau menolak hipotesis penelitian didasarkan pada nilai signifikansi sebesar 5% ($p < 0.05$). Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi SPSS for windows versi 27.0.



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

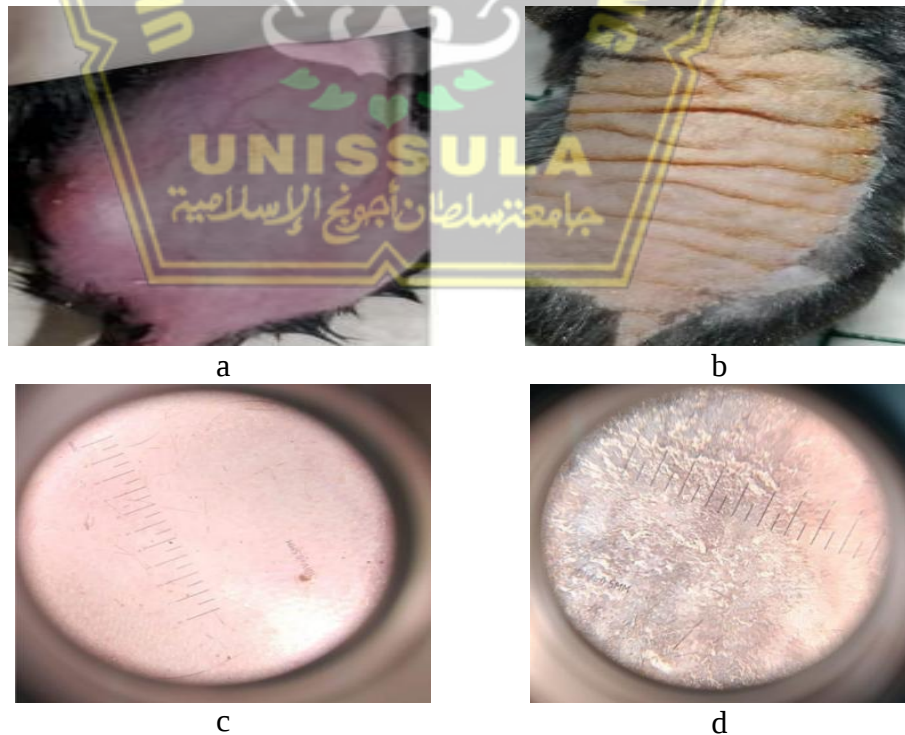
5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian serum ekstrak buah mulberry (*Morus alba L.*) terhadap kadar endotelin-1 dan tirosinase pada mencit jantan C57BL/6 hiperpigmentasi akibat paparan ultraviolet B (UV-B). Total subjek penelitian berjumlah 34 ekor mencit yang terbagi ke 5 lima kelompok, yaitu kelompok sehat (K1), kelompok kontrol negatif yang dipapar UV-B tanpa diberikan terapi (K2), kelompok kontrol positif yang dipapar UV-B dan terapi hidrokuinon 2% (K3), kelompok perlakuan yang dipapar UV-B dan terapi serum ekstrak mulberry 5% (K4), serta kelompok perlakuan yang dipapar UV-B dan terapi serum ekstrak mulberry 10% (K5). Setiap kelompok terdiri atas 6 ekor mencit, kecuali pada kelompok K1 dan K2 yang ditambahkan masing-masing 2 ekor untuk validasi munculnya hiperpigmentasi akibat paparan UV-B. Paparan UV-B diberikan selama 14 hari, kemudian dilanjutkan dengan perlakuan pemberian perlakuan hidrokuinon 2%, serum ekstrak mulberry dosis 5% dan 10% selama 5 hari.

Validasi model hiperpigmentasi dilakukan pada masing-masing 2 ekor mencit pada K1 dan K2 yang diamati menggunakan kamera dan dermoskop riester ri-scope ri-derma pada hari ke-22. Pada hari ke-7 terdapat 1 ekor mencit yang mati pada K2 dan hari ke-9 terdapat 1 ekor mencit yang mati pada K4, sehingga kadar endotelin-1 dan tirosinase dianalisa 5 ekor mencit/ kelompok.

5.1.1 Gambaran makroskopis dan mikroskopis jaringan kulit mencit menggunakan dermoskop riester ri-scope ri-derma untuk validasi model hiperpigmentasi

Paparan UV-B pada panjang gelombang 302 nm dengan kekuatan 180 mJ/cm² selama 10 menit per hari selama 14 hari menyebabkan hiperpigmentasi pada kulit mencit kelompok perlakuan, berbeda dengan kulit mencit yang normal. Hasil pengamatan makroskopis menggunakan dermoskop riester ri-scope ri-dermais menunjukkan bahwa kulit mencit dalam kondisi normal sebelum perlakuan memiliki permukaan yang halus, berwarna merah muda, dan tanpa adanya pigmentasi berlebih atau perubahan tekstur yang mencolok (Gambar 5.1). Hiperpigmentasi pada kulit mencit yang dipapar UV-B ditandai dengan peningkatan coklat kekuningan munculnya lipatan-lipatan kulit, dan penebalan permukaan (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Gambaran makroskopis jaringan kulit mencit menggunakan alat dermoskop riester ri-scope ri-derma: (a). Mencit yang tidak dipapar UV-B, (b). Mencit yang dipapar UV-B selama 14 hari menunjukkan tanda-tanda hiperpigmentasi, (c). foto kulit mencit yang tidak dipapar UV-B dengan dermoskop riester ri-scope ri-derma, (c). foto kulit mencit mengalami hiperpigmentasi dengan dermoskop riester ri-scope ri-derma.

Hasil pemeriksaan histopalogi jaringan kulit mencit dengan pewarnaan Masson Fontana pada kelompok negatif tanpa paparan UV-B dan kelompok positif dengan paparan UV-B selama 14 hari (Gambar 5.2). Sebelum paparan UV-B tampak bahwa jumlah granula melanin di lapisan basal epidermis tampak sedikit dan tersebar tipis, sedangkan pada paparan UV-B selama 14 hari menyebabkan peningkatan jumlah granula melanin yang padat dan pekat hingga ke lapisan suprabasal (Gambar 5.2).



Gambar 5.2 Hasil pengamatan histopalogi preparat jaringan kulit dengan pewarnaan Masson Montana untuk mencit sebelum dipaparan UV-B (a), dan sesudah dipapara UV-B selama 14 hari (b).

Selain gambaran mikroskopis juga dilakukan perhitungan sel melanosit sebanyak 3 lapang pandang pembacaan dengan perbesar 40X

Tabel 5.1. Hasil pembacaan sel Melonasit

Kelompok	N	Lapang Pandang Pembacaan 400x			Rata-rata
		I	II	III	
KN	1	32	30	30	31
	2	31	31	30	31
UV-B	1	42	41	40	41

2 41 40 41 41

Dari tabel 5.1 hasil pembacaan sel Melanosit didapatkan jumlah sel dikedua kelompok yang dilakukan uji validasi ini terlihat adanya peningkatan jumlah sel melanosit dari kelompok UV-B dibandingkan kelompok KN, artinya untuk paparan Paparan UV-B ini berhasil karena adanya peningkatan sel melonosit.

Model hiperpigmentasi yang diinduksi melalui paparan UV-B pada penelitian ini terbukti valid untuk digunakan pada tahap uji perlakuan, karena secara histologis menunjukkan peningkatan jumlah melanosit dan akumulasi melanin di lapisan epidermis. Peningkatan deposit melanin ini merepresentasikan aktivasi proses melanogenesis yang menyerupai mekanisme hiperpigmentasi fisiologis maupun patologis pada kulit manusia, sehingga model ini relevan untuk mengevaluasi efektivitas agen depigmentasi.

5.1.2 Kadar Endotelin-1 pada jaringan kulit

Hasil analisis ELISA dari supernatan jaringan kulit mencit menunjukkan bahwa rerata kadar endothelin-1 pada kelompok sehat (K1) paling rendah dibandingkan dengan kelompok yang dipapar UV-B (K2), sedangkan pemberian hidrokuionen (K3), serum ekstrak mulberry konsentrasi 5% (K4) dan serum ekstrak mulberry konsentrasi 10% (K5) menyebabkan kenaikan kadar endothelin 1 (Tabel 5.2 dan Gambar 5.2).

Tabel 5.2 Kadar Endothelin-1 pada jaringan kulit

Kelompok Perlakuan	Kadar endhotelin-1 (ng/L)	Nilai <i>p</i>		
		Normalitas distribusi data dengan Saphiro Wilk	Homogenitas varian data dengan Levene Test	Hasil uji beda dengan Kruskall Wallis

Kontrol sehat (K1)	123,23 ± 30,20	0,048		
Kontrol negatif /UV-B (K2)	127,15 ± 12,59	0,952		
Kontrol Positif UV-B+Hidrokuinon 2% (K3)	165,17 ± 13,34	0,888	0,004	0,010
UV-B+Serum ekstrak mulberry 5% (K4)	150,36 ± 14,47	0,684		
UV-B+Serum ekstrak mulberry 10% (K4)	159,87 ± 11,30	0,829		

Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa terdapat 1 kelompok (K1) yang memiliki data kadar endotelin-1 yang tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) sedangkan distribusi data kadar endhotelin-1 pada K2,K3, K4, dan K5 terdistribusi normal ($p > 0,05$). Hasil uji Levene's Test menunjukkan bahwa data kadar endhotelin-1 memiliki varian data yang tidak homogen dengan nilai $p = 0,004$ ($p > 0,05$). Uji beda antar dianalisis statistik non-parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney karena tidak memenuhi syarat parametrik. Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai $p = 0,010$ ($p < 0,05$), yang menandakan terdapat minimal ada 1 pasang kelompok perlakuan yang memiliki rerata kadar endhotelin yang berbeda secara signifikan.

Hasil ini menunjukkan bahwa paparan UV-B dapat meningkatkan kadar Endothelin-1, dan pemberian serum ekstrak buah mulberry secara topikal mampu menurunkan kadar tersebut meskipun belum sepenuhnya mencapai kadar yang setara dengan kelompok sehat.

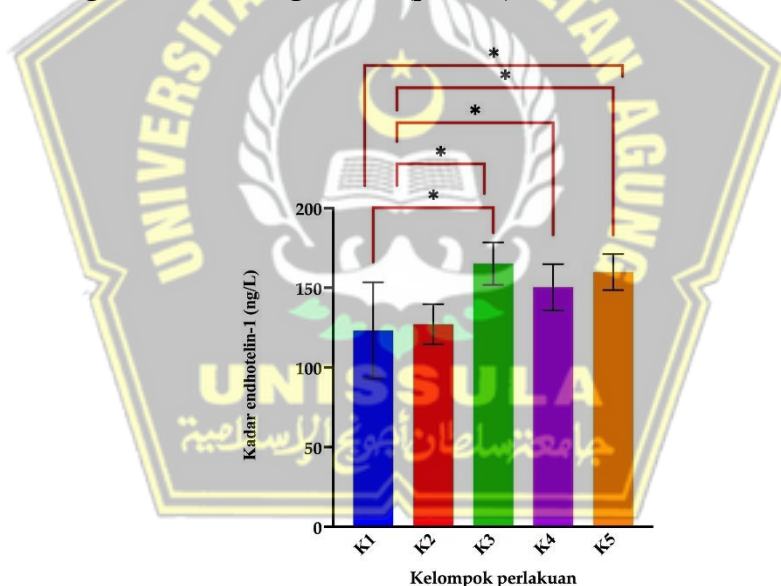
Tabel 5.3 menunjukkan hasil uji *Mann-Whitney* dimana terdapat perbedaan signifikan rerata kadar endhotelin-1 pada K1 dengan kelompok yang mendapat perlakuan hidrokuinon (K3) dan ekstrak mulberry dosis tinggi (K5), namun tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok yang

hanya terpapar UV-B (K2) maupun yang mendapat ekstrak mulberry dosis rendah (K4). Paparan UV-B tanpa perlakuan maupun perlakuan dengan ekstrak mulberry dosis rendah belum menyebabkan perubahan kadar Endothelin-1 yang signifikan dibandingkan kondisi normal.

Tabel 5.3 Uji *Mann-Whitney* kadar Endothelin-1 pada tiap kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1		0,754	0,028*	0,175	0,028*
K2	0,754		0,016*	0,028	0,016*
K3	0,028*	0,016*		0,117	0,465
K4	0,175	0,028*	0,117		0,251
K5	0,028*	0,016*	0,465	0,251*	

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



Gambar 5.2 Kadar endothelin-1 dari jaringan kulit mencit pada tiap kelompok perlakuan

5.1.3 Kadar Tirosinase jaringan kulit

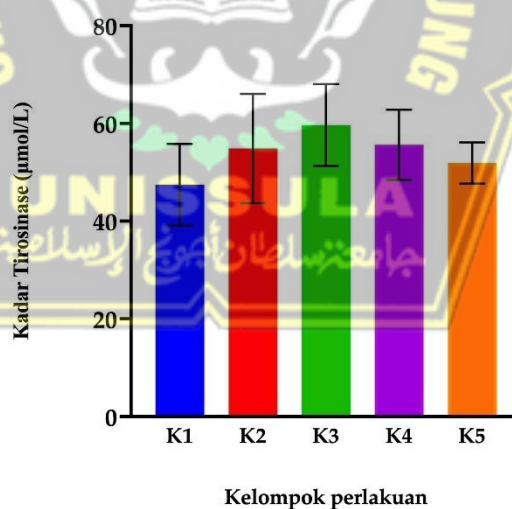
Tabel 5.4 dan Gambar 5.3 menunjukkan rerata kadar tirosinase ($\mu\text{mol/L}$) pada jaringan kulit dimana kadar tirosinase tertinggi ditemukan pada kelompok hidrokuinon (K3), sedangkan kadar terendah terdapat pada kelompok sehat (K1). Nilai yang lebih tinggi secara berurutan pada

kelompok K3 ($59,66 \pm 8,38 \mu\text{mol/L}$), K4 ($55,62 \pm 7,20 \mu\text{mol/L}$), K2 ($54,86 \pm 11,18 \mu\text{mol/L}$), K5 ($51,90 \pm 4,21 \mu\text{mol/L}$), dan K1 ($47,46 \pm 8,35 \mu\text{mol/L}$).

Tabel 5.4

Tabel 5. 4 Kadar Tirosinase pada jaringan kulit

Kelompok Perlakuan	Kadar Tirosinase ($\mu\text{mol/L}$)	Nilai <i>p</i>		
		Normalitas distribusi data dengan Saphiro Wilk	Homogenitas varian data dengan Levene Test	Hasil uji beda dengan <i>Oneway Anova</i>
Kontrol sehat (K1)	$47,46 \pm 8,35$	0,865	0,564	0,228
Kontrol negatif /UV-B (K2)	$54,86 \pm 11,18$	0,570		
Kontrol Positif UV-B+Hidrokuinon 2% (K3)	$59,66 \pm 8,38$	0,886		
UV-B+Serum ekstrak mulberry 5% (K4)	$55,62 \pm 7,20$	0,460		
UV-B+Serum ekstrak mulberry 10% (K4)	$51,90 \pm 4,21$	0,274		



Gambar 5.3 Kadar Tirosinase (umol/L) pada tiap kelompok perlakuan

Analisis terhadap kadar tirosinase menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen. Hal ini ditunjukkan oleh nilai $p > 0,05$ baik pada uji *Shapiro-Wilk* $p > 0,05$ maupun *Levene's Test* ($p = 0,564$). Hasil

uji *One Way ANOVA* diperoleh nilai $p = 0,228$ ($p > 0,05$), sehingga tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara kelompok perlakuan terhadap kadar tirosinase jaringan kulit. Sebagaimana disajikan pada Gambar 5.3 secara deskriptif terlihat adanya variasi kadar tirosinase pada jaringan kulit tikus antarkelompok. Kelompok yang terpapar UV-B dan diberi perlakuan hidrokuinon menunjukkan kadar tirosinase lebih tinggi, diikuti oleh kelompok perlakuan ekstrak mulberry dosis 5%, kelompok negatif (paparan UV-B tanpa perlakuan), dan kelompok perlakuan ekstrak mulberry dosis 10%. Sementara itu, kadar terendah ditemukan pada kelompok sehat yang tidak mengalami paparan maupun perlakuan.

5.2 PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan UV-B selama 14 hari dengan panjang gelombang 302 nm dengan energi sebesar 180 mJ/cm² mampu menginduksi hiperpigmentasi pada kulit mencit. Paparan UV-B berhasil menginduksi hiperpigmentasi pada kulit mencit, yang dibuktikan melalui pengamatan makroskopis menggunakan kamera dan dermoskop riester ri-scope ri-derma, serta analisis mikroskopis dengan pewarnaan Masson-Fontana. Kondisi hiperpigmentasi tersebut ditandai dengan meningkatnya warna coklat kekuningan, terbentuknya lipatan dan penebalan permukaan kulit, serta bertambahnya granula melanin pada lapisan basal epidermis.⁷⁵ Hiperpigmentasi akibat paparan UV-B ditandai dengan meningkatnya kadar endotelin-1 (ET-1) dan tirosinase sebagai indikator aktivasi melanosit. Paparan UV-B diketahui memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang secara tidak langsung meningkatkan kadar ET-

1, yang selanjutnya menginduksi tirosinase sebagai enzim kunci dalam proses melanogenesis.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa mencit yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan UV-B tanpa pemberian serum (K2) memiliki kadar ET-1 dan kadar tirosinase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok mencit sehat yang tidak dipapar UV-B (K1). Hal ini disebabkan karena UV-B merangsang peningkatan ROS yang kemudian mengaktifasi kadar ET-1, yang selanjutnya merangsang kadar tirosinase dalam melanosit, mempercepat proses melanogenesis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan UV-B selama 14 hari berhasil menginduksi hiperpigmentasi pada kulit mencit, yang ditandai oleh meningkatnya kadar endothelin-1 (ET-1) dan tirosinase sebagai indikator aktivasi melanosit. Fenomena tersebut selaras dengan konsep bahwa UV-B memicu stres oksidatif yang kemudian memicu peningkatan kadar ET-1, dan secara downstream menyebabkan aktivasi tirosinase serta akumulasi melanin dalam jaringan kulit. ET-1 secara substansial berperan sebagai mediator intrinsik utama dalam mekanisme melanogenesis yang dipicu oleh UV-B, di mana penghambatan ET-1 secara efektif mengurangi aktivitas tirosinase dan sintesis melanin.⁷⁶

Pemberian hidrokuinon 2% dan serum ekstrak mulberry konsentrasi 5% dan 10% masing-masing pada kelompok K3, K4, dan K5 menyebabkan peningkatan kadar ET-1 dan kadar tirosinase dibandingkan dengan K2. Hal ini menunjukkan bahwa hidrokuinon dan serum ekstrak mulberry bertolak belakang dengan efek depigmentasi yang diharapkan. Peningkatan ini dapat dijelaskan melalui dua mekanisme potensial: pertama, ET-1 diproduksi secara berlebihan oleh sel endotel

atau keratinosit sebagai respons terhadap stres atau iritasi, kemudian mengaktifkan jalur MAPK (ERK1/2 dan p38) serta MITF pada melanosit dan meningkatkan sintesis tirosinase.⁷⁷ Meskipun ekstrak mulberry umumnya mengandung flavonoid dan antosianin berperan sebagai antioksidan, pada dosis tinggi senyawa ini dapat berubah menjadi pro-oksidan, menginduksi ROS yang justru mengaktifkan jalur melanogenesis.⁷⁸ Secara teoritis, kadar ET-1 dan tirosinase pada kelompok hidrokuinon (K3) seharusnya lebih rendah dibandingkan kontrol negatif yang dipaparkan UV-B (K2) karena hidrokuinon bekerja dengan menurunkan aktivitas tirosinase dan menghambat melanogenesis. Namun, hasil penelitian menunjukkan nilai yang justru lebih tinggi, kemungkinan akibat paparan UV-B yang tetap memicu keratinosit melepaskan ET-1 dan tirosinase sebagai respons terhadap stres oksidatif, sifat hidrokuinon yang tidak secara langsung menekan produksi ET-1 dan tirosinase, serta potensi efek iritatifnya yang dapat memicu inflamasi dan meningkatkan sekresi ET-1 dan tirosinase. Selain itu, faktor teknis seperti durasi perlakuan yang belum optimal, kemungkinan degradasi sediaan akibat sifat fotolabil hidrokuinon, serta variasi biologis antar subjek dapat turut memengaruhi hasil yang diperoleh.⁷⁹ Dalam penelitian ini, perlakuan diberikan 5 hari setelah paparan UVB, sehingga kemungkinan membutuhkan durasi lebih lama, mengingat peningkatan ET-1 terjadi pada fase tertunda (5–10 hari pasca-UVB) setelah peningkatan awal *stem cell factor* (SCF), yang menunjukkan peran sitokin-sitokin tersebut berlangsung secara terkoordinasi namun berbeda waktu dalam proses pigmentasi.⁸⁰

Selain itu, keragaman biologis antar mencit, seperti perbedaan respons pigmentasi individu atau kadar dasar endotelin-1 dan tirosinase, juga mungkin memengaruhi tidak ditemukannya perbedaan yang signifikan. Paparan UVB juga dapat memicu reaksi kompleks dalam mekanisme regulasi kulit, sehingga berpotensi menghasilkan kadar indikator yang bervariasi dan tidak sepenuhnya bergantung pada keberhasilan perlakuan. Waktu pengambilan sampel mungkin kurang tepat untuk menangkap perubahan puncak, atau jalur spesifik yang dipengaruhi oleh ekstrak mulberry dan hidrokuinon mungkin memerlukan durasi lebih lama atau konsentrasi lebih tinggi agar dapat menunjukkan penurunan yang signifikan. Temuan ini mengindikasikan bahwa penelitian lanjutan dengan jumlah sampel lebih besar, modifikasi dosis, atau variasi waktu perlakuan mungkin diperlukan untuk memperjelas hubungan antara penanda pigmentasi akibat UVB dan efektivitas perlakuan, sehingga hasil yang diperoleh lebih sesuai dengan ekspektasi teoritis.

Peningkatan konsentrasi serum mulberry dari 5% ke 10% menyebabkan penurunan kadar ET-1, bahkan lebih rendah dibandingkan kelompok hidrokuinon. Kadar ET-1 pada kelompok konsentrasi 5% tidak berbeda bermakna, menunjukkan adanya efek dosis-respon, di mana kandungan bioaktif mulberry seperti antosianin, flavonoid, dan asam fenolat mulai memberikan efek biologis optimal pada konsentrasi yang lebih tinggi. Pada konsentrasi serum mulberry 5% lebih menurunkan kadar ET-1 dibandingkan dengan konsentrasi serum mulberry 10%, hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sejalan dengan penelitian Wang *et al.* (2024) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak mulberry dengan konsentrasi 5%

terbukti lebih efektif menurunkan kadar ET-1.⁷⁴ Senyawa aktif dalam mulberry seperti flavonoid, antosianin, dan resveratrol pada dosis 5% dapat menghambat ekspresi gen ET-1 dan aktivitas *endothelin converting enzyme* (ECE) secara efisien, sementara pada dosis 10% kemungkinan terjadi interaksi antagonis antar senyawa atau peningkatan beban metabolik yang memicu stres oksidatif ringan, sehingga pelepasan ET-1 dapat meningkat kembali. Penelitian ini mengindikasikan bahwa ekstrak mulberry memiliki titik dosis optimal pada konsentrasi sedang untuk memberikan manfaat maksimal terhadap penurunan ET-1.⁷⁶

Meskipun kadar tirosinase antara kelompok 5% dan 10% tidak berbeda secara bermakna, namun kadar tirosinase pada kelompok K5 (10%) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K4 (5%) dan hampir setara dengan kelompok K1 (kontrol sehat). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin kuat efek penghambatan terhadap jalur pigmentasi. Kandungan bioaktif mulberry seperti flavonoid dan antosianin berperan sebagai inhibitor enzim tirosinase dan menekan kadar ET-1 melalui penghambatan jalur NF- κ B dan MITF, yang merupakan regulator penting dalam sintesis melanin.¹⁴

Keterbatasan dari penelitian ini adalah belum dilakukannya analisis kadar genetik dari ET-1 maupun tirosinase secara molekuler, seperti melalui PCR atau imunohistokimia, untuk memperkuat bukti jalur kerja ekstrak mulberry. Selain itu, penelitian ini hanya berfokus pada efek lokal kulit dan belum mengevaluasi kemungkinan efek sistemik dari penggunaan ekstrak mulberry secara topikal. Variabel inflamasi seperti TNF- α atau IL-1 β , yang berkaitan erat dengan

hiperpigmentasi akibat stres oksidatif, juga belum dianalisis sehingga keterkaitan antara peradangan dan pigmentasi belum tergambarkan secara menyeluruh.



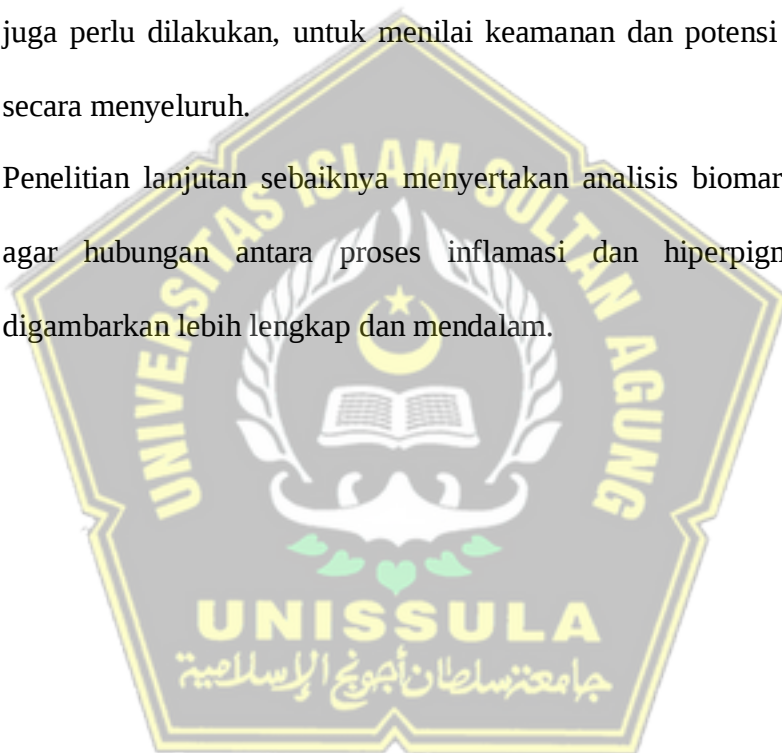
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Pemberian serum ekstrak mulberry (*Morus alba* L.) berpengaruh terhadap kadar endothelin-1 namun tidak berpengaruh terhadap kadar tirosinase pada mencit C57BL/6 yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan UV-B.
- b. Kadar Endothelin-1 pada kelompok hidrokuinon ($127,15 \pm 12,59$) dan serum ekstrak mulberry dosis 10% ($159,87 \pm 11,30$) lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat ($123,23 \pm 30,20$). Serum ekstrak mulberry dosis 5% ($150,36 \pm 14,47$) memiliki kadar Endothelin-1 lebih rendah dibandingkan dosis 10% dan hidrokuinon.
- c. Kadar tirosinase tertinggi terdapat pada kelompok hidrokuinon ($59,66 \pm 8,38$) dan terendah pada kelompok sehat ($47,46 \pm 8,35$). Namun, perbedaan tersebut tidak signifikan secara statistik ($p = 0,228$), sehingga perlakuan yang diberikan belum memberikan efek bermakna terhadap kadar tirosinase.
- d. Ekstrak mulberry dosis 5% lebih efektif menurunkan kadar Endothelin-1, sedangkan dosis 10% ($51,90 \pm 4,21$) cenderung lebih rendah kadar tirosinasenya dibandingkan dosis 5% ($55,62 \pm 7,20$), meskipun belum menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik.

6.2. Saran

- a. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan analisis kadar genetik ET-1 dan tirosinase menggunakan metode molekuler seperti PCR atau imunohistokimia, guna memperkuat pemahaman terhadap mekanisme kerja ekstrak mulberry dalam menghambat hiperpigmentasi.
- b. Evaluasi terhadap efek sistemik dari penggunaan topikal ekstrak mulberry juga perlu dilakukan, untuk menilai keamanan dan potensi efek samping secara menyeluruh.
- c. Penelitian lanjutan sebaiknya menyertakan analisis biomarker inflamasi, agar hubungan antara proses inflamasi dan hiperpigmentasi dapat digambarkan lebih lengkap dan mendalam.



DAFTAR PUSTAKA

1. Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, et al. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 61: 7395–7418.
2. Tagashira H, Miyamoto A, Kitamura SI, et al. UV-B stimulates the expression of endothelin B receptor in human melanocytes via a sequential activation of the p38/MSK1/CREB/MITF pathway which can be interrupted by a French maritime pine bark extract through a direct inactivation of MSK1. *PLoS One* 2015; 10: 1–17.
3. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus*; 15. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.7759/cureus.48840.
4. Huyen NT, Thu DK, Tien NM, et al. Tyrosinase Inhibitory Impact of *Morus alba* L. Root Bark: In Vitro and In Silico Studies. *Research Journal of Pharmacognosy* 2024; 11: 27–37.
5. Wang B, An X, Qu L, et al. Review on oral plant extracts in Skin Whitening. *Food Science and Technology (Brazil)* 2022; 42: 1–10.
6. Zhao C, Wu S, Wang H. Medicinal Plant Extracts Targeting UV-Induced Skin Damage: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* 2025; 26: 1–34.
7. Nguyen LTH. Biological Activities of Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*): More than a Skin-Lightening Agent. *Cosmetics*; 9. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/cosmetics9060112.
8. Numanovich AI, Abbosxonovich MA. a comprehensive review of herbal face serum. *EPRA International Journal of Multidisciplinary Research (IJMR)-Peer Reviewed Journal* 2020; 198–210.
9. Dewi NLPAC, Prasasti A, Wijiani N. Uji Formulasi Dan Evaluasi Fisik Krim Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.). 2024.
10. Gryn-Rynko A, Sperkowska B, Majewski MS. Screening and Structure–Activity Relationship for Selective and Potent Anti-Melanogenesis Agents Derived from Species of Mulberry (Genus *Morus*). *Molecules*; 27. Epub ahead of print December 1, 2022. DOI: 10.3390/molecules27249011.
11. Riski R, Aisyah An, Awaluddin A. Formulasi Krim Pemutih Dari Fitosom Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba* L.). 2020.
12. Hamed S, Afifi F, Mansi I, et al. *Screening of commonly used plant extracts in Jordanian skin lightening folkloric recipes for their tyrosinase inhibitory activity: An in vitro study*. 2021.
13. Budiman A, Praditasari A, Rahayu D, et al. Formulation of antioxidant gel from black mulberry fruit extract (*Morus nigra* L.). *J Pharm Bioallied Sci* 2023; 11: 216–222.
14. Kucuk SD, Groso A, Collet G, et al. Effect of Bacterial Nanocellulose and Plant-Containing Facial Serum on Hyperpigmentation in in-vitro Conditions. *Bioresources* 2024; 19: 3208–3233.

15. Guden D, Temiz M, Tunctan B, et al. The role of endothelin-1 and new therapeutic approaches in sepsis and septic shock. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences* 2015; 5: 1.
16. Murase D, Hachiya A, Kikuchi-Onoe M, et al. Cooperation of endothelin-1 signaling with melanosomes plays a role in developing and/or maintaining human skin hyperpigmentation. *Biol Open* 2015; 4: 1213–1221.
17. Harrison M, Zinovkin D, Pranjol MZI. Endothelin-1 and Its Role in Cancer and Potential Therapeutic Opportunities. *Biomedicines* 2024; 12: 1–18.
18. Swope VB, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 and endothelin B receptors in melanocyte homeostasis and prevention of sun-induced genotoxicity. *Front Genet* 2016; 7: 1–11.
19. Bull HA, Dowd PM. Endothelin-1 in human skin. *Dermatology* 1993; 187: 1–5.
20. Banecki KMRM, Dora KA. Endothelin-1 in Health and Disease.
21. Hyter S, Coleman DJ, Ganguli-Indra G, et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; 26: 247–258.
22. Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, et al. The Role of Endothelin-1 in Epidermal Hyperpigmentation and Signaling Mechanisms of Mitogenesis and Melanogenesis. *Pigment Cell Res* 1997; 10: 218–228.
23. Zhang P, Liu W, Yuan X, et al. Endothelin-1 enhances the melanogenesis via MITF-GPNMB pathway. *BMB Rep* 2013; 46: 364–369.
24. Regazzetti C, De Donatis GM, Ghorbel HH, et al. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin Receptor B activation. *Journal of Investigative Dermatology* 2015; 135: 3096–3104.
25. Hijayanti R, Rahmat D, Djamil R. Analisis Senyawa Fitokimia, Organoleptik, Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Tirosinase Minyak Biji Argan (*Argan spinosa* L.) dan Ekstrak Akar Murbei (*Morus Alba* L.) Sebagai Whitening Agent Pada Kulit. *Ghidza: Jurnal Gizi dan Kesehatan* 2023; 7: 157–165.
26. Rauf A, Ningsi S, Hasriani A, et al. Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak Metanol Klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm F.). *Jurnal Kesehatan* 2020; 1: 17–24.
27. Sholikha M, Wahyuningtyas, Puspitasari L. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Oleh Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) Secara In Vitro Tyrosinase Enzyme Inhibition Activity Test by Ethanol Extract of Taro Leaf (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) In. *Jurnal Ilmu Kefarmasian* 2023; 16: 1–6.
28. Kim H Do, Choi H, Abekura F, et al. Naturally-Occurring Tyrosinase Inhibitors Classified by Enzyme Kinetics and Copper Chelation. *International Journal of Molecular Sciences*; 24. Epub ahead of print May 1, 2023. DOI: 10.3390/ijms24098226.
29. Tang M, Duan T, Lu Y, et al. Tyrosinase-Woven Melanin Nets for Melanoma Therapy through Targeted Mitochondrial Tethering and

- Enhanced Photothermal Treatment. *Advanced Materials*. Epub ahead of print November 1, 2024. DOI: 10.1002/adma.202411906.
30. Hering A, Stefanowicz-Hajduk J, Dziomba S, et al. Mangiferin Affects Melanin Synthesis by an Influence on Tyrosinase: Inhibition, Mechanism of Action and Molecular Docking Studies. *Antioxidants*; 12. Epub ahead of print May 1, 2023. DOI: 10.3390/antiox12051016.
 31. Yu ZY, Xu K, Wang X, et al. Punicalagin as a novel tyrosinase and melanin inhibitor: Inhibitory activity and mechanism. *LWT*; 161. Epub ahead of print May 1, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113318.
 32. Yu F, Lu Y, Zhong Z, et al. Mitf Involved in Innate Immunity by Activating Tyrosinase-Mediated Melanin Synthesis in Pteria penguin. *Front Immunol*; 12. Epub ahead of print May 20, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.626493.
 33. Zhu Y, Li Q. *Mitf involved in shell pigmentation by activating tyrosinase-mediated melanin 2 synthesis in Pacific oyster (Crassostrea gigas)*, <https://ssrn.com/abstract=4596835> (2021).
 34. Alam MB, Park NH, Song BR, et al. Antioxidant Potential-Rich Betel Leaves (Piper betle L.) Exert Depigmenting Action by Triggering Autophagy and Downregulating MITF/Tyrosinase In Vitro and In Vivo. *Antioxidants*; 12. Epub ahead of print February 1, 2023. DOI: 10.3390/antiox12020374.
 35. Chen T, Shuang FF, Fu QY, et al. Evaluation of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Mulberry (Morus alba L.) Fruits from Different Varieties in China. *Molecules*; 27. Epub ahead of print May 1, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092688.
 36. Mukattash HK, Issa R, Abu Hajleh MN, et al. Inhibitory Effects of Polyphenols from Equisetum ramosissimum and Moringa peregrina Extracts on Staphylococcus aureus, Collagenase, and Tyrosinase Enzymes: In vitro Studies. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2024; 17: 530–548.
 37. Fu C, Chen J, Lu J, et al. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep* 2020; 21: 1421–1430.
 38. Yoo J. Differential diagnosis and management of hyperpigmentation. *Clinical and Experimental Dermatology* 2022; 47: 251–258.
 39. Thawabteh AM, Jibreen A, Karaman D, et al. Skin Pigmentation Types, Causes and Treatment—A Review. *Molecules*; 28. Epub ahead of print June 1, 2023. DOI: 10.3390/molecules28124839.
 40. Rathee P, Kumar S, Kumar D, et al. Skin hyperpigmentation and its treatment with herbs: an alternative method. *Futur J Pharm Sci*; 7. Epub ahead of print July 2, 2021. DOI: 10.1186/s43094-021-00284-6.
 41. Lee AY. Skin pigmentation abnormalities and their possible relationship with skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*; 22. Epub ahead of print April 1, 2021. DOI: 10.3390/ijms22073727.
 42. Xing X, Dan Y, Xu Z, et al. Implications of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Treatment of Hyperpigmentation Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2022. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1155/2022/7881717.

43. Chen J, Jiang S, Zheng J, et al. Oxidative Stress in the Skin: Impact and Related Protection. *Int J Cosmet Sci* 2021; 43: 495–509.
44. Maghfour J, Olayinka J, Hamzavi IH, et al. A Focused review on the pathophysiology of post-inflammatory hyperpigmentation. *Pigment Cell and Melanoma Research* 2022; 35: 320–327.
45. Markiewicz E, Karaman-Jurukovska N, Mammone T, et al. Post-Inflammatory Hyperpigmentation in Dark Skin: Molecular Mechanism and Skincare Implications. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2022; 15: 2555–2565.
46. Yoon JH, Jo CS, Hwang JS. Comprehensive Analysis of Exosomal MicroRNAs Derived from UV-B-Irradiated Keratinocytes as Potential Melanogenesis Regulators. *Int J Mol Sci*; 25. Epub ahead of print March 1, 2024. DOI: 10.3390/ijms25063095.
47. Yang CY, Guo Y, Wu WJ, et al. UV-B-Induced Secretion of IL-1 β Promotes Melanogenesis by Upregulating TYR/TRP-1 Expression In Vitro. *Biomed Res Int*; 2022. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1155/2022/8230646.
48. Wang JH, Hwang SJ, Lee SK, et al. Anti-Melanogenic Effects of Fractioned *Cynanchum atratum* by Regulation of cAMP/MITF Pathway in a UV-B-Stimulated Mice Model. *Cells*; 12. Epub ahead of print May 1, 2023. DOI: 10.3390/cells12101390.
49. Moolla S, Miller-Monthrope Y. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs Context* 2022; 11: 1–14.
50. Huyen NT, Thu DK, Tien NM, et al. Tyrosinase Inhibitory Impact of *Morus alba* L. Root Bark: In Vitro and In Silico Studies. *Research Journal of Pharmacognosy* 2024; 11: 27–37.
51. Jan B, Zahiruddin S, Basist P, et al. Metabolomic Profiling and Identification of Antioxidant and Antidiabetic Compounds from Leaves of Different Varieties of *Morus alba* Linn Grown in Kashmir. *ACS Omega* 2022; 7: 24317–24328.
52. Polumackanycz M, Wesolowski M, Viapiana A. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. Leaves as a Promising Food Source of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2021; 76: 458–465.
53. Langeder J, Döring K, Schmietendorf H, et al. ¹H NMR-Based Biochemometric Analysis of *Morus alba* Extracts toward a Multipotent Herbal Anti-Infective. *J Nat Prod* 2023; 86: 8–17.
54. Wang H, Chen X, Li J, et al. Oxyresveratrol from mulberry (*Morus alba* L.) ameliorates post-inflammatory hyperpigmentation in vitro by anti-melanogenesis, inhibiting melanosome transfer, and providing photoprotection. *J Funct Foods*; 122. Epub ahead of print November 1, 2024. DOI: 10.1016/j.jff.2024.106557.
55. Liu X, Rao J, Wang K, et al. Highly Potent Inhibition of Tyrosinase by Mulberrosides and the Inhibitory Mechanism in Vitro. *Chem Biodivers*; 19. Epub ahead of print January 1, 2022. DOI: 10.1002/cbdv.202100740.
56. Khanpara P, Sojitra N. A Review on Medicinal Activities of Mulberry Weed. *Journal of Medicinal Plants Studies* 2022; 10: 103–111.

57. Upadhyay S, Upadhyay P. Clinical Trials and Clinical Research A Minireview on Hyperpigmentation its Mechanism and Remedies Sukirti upadhyay1and prashant upadhyay1. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.31579/2834-5126/01.
58. Khanpara P, Sojitra N. A review on medicinal activities of mulberry weed. *Journal of Medicinal Plants Studies* 2022; 10: 103–111.
59. Bobaya SJ, Latuconsina VZ, Kailola N. Efek Pemberian Ekstrak Daun Tanaman Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap Kadar Gula Darah Mencit. *Molucca Medica* 2023; 16: 88–97.
60. Herawati E, Setyawan VA, Listyawati S. Peptida Kolagen Ikan Layang Biru (*Decapterus macarellus*) Mempercepat Penyembuhan Luka Pada Mencit. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* 2023; 8: 278.
61. Soyata A, Chaerunisaa AY. Whitening Agent : Mekanisme, Sumber dari Alam dan Teknologi Formulasinya. *Majalah Farmasetika* 2021; 6: 169.
62. Hidayat RN. Bawang Tiwai (*Eleutherine Americana*) Sebagai Krim Tabir Surya Mencegah Melanogenesis. 2021.
63. Nasti L, Arisanty R, Lubis S. Perbandingan Efektivitas Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L.*) Sebagai Agen Pelindung Kulit Dari Sinar Uva Dan UV-B Pada Mencit Putih (*Mus Musculus*). 7. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.28983972.
64. Reno Intan P, Noviantari A, Riset Biomedis P, et al. Penggunaan Mencit dan Tikus Sebagai Hewan Model Penyakit Stroke. *Jurnal Pendidikan Fisika*.
65. Ekawati N, Wulandari F. Review: Pengaruh Suplementasi Astaxanthin Dalam Mencegah Photoaging Effect of Astaxhantin Supplementation to Pevent Photoaging : a Review. 2021.
66. Putu Khrisna Dharma Jaya, Putu Indah Budi Apsari, Pande Made Alitta Cantika Putri Nadya Dewi, et al. Effects of *Moringa oleifera* Extract as an Immunomodulator of Lymphocyte Cells and Macrophages in BALB/c Mice Infected with *Plasmodium berghei*. *Folia Medica Indonesiana* 2023; 59: 214–221.
67. Hidayat R, Patricia Wulandari. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique Guideline. *Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research* 2021; 5: 447–453.
68. Tang W, Qi Y, Li Z. A portable, cost-effective and user-friendly instrument for colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay and rapid detection of aflatoxin b1. *Foods*; 10. Epub ahead of print October 1, 2021. DOI: 10.3390/foods10102483.
69. Kwon MS, Kim SJ, Park JH. Cellular Mechanisms in Melasma: Melanocyte Hyperactivity and Dermal Alterations. *Journal of Clinical Aesthetic Dermatology* 2023; 16: 12–22.
70. Pan C, Liu X, Zheng Y, et al. The mechanisms of melanogenesis inhibition by glabridin: molecular docking, PKA/MITF and MAPK/MITF pathways. *Food Science and Human Wellness* 2022; 12: 212–222.
71. Kim KS, Choi YJ, Jang DS, et al. 2-O-β-d-Glucopyranosyl-4,6-dihydroxybenzaldehyde Isolated from *Morus alba* (Mulberry) Fruits

- Suppresses Damage by Regulating Oxidative and Inflammatory Responses in TNF- α -Induced Human Dermal Fibroblasts. *Int J Mol Sci*; 23. Epub ahead of print December 1, 2022. DOI: 10.3390/ijms232314802.
72. Federer WT. Experimental Design Theory And Application, Third Edition, Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta.
 73. Lin MY, Lim LM, Tsai SP, et al. Low dose ultraviolet B irradiation at 308 nm with light-emitting diode device effectively increases serum levels of 25(OH)D. *Sci Rep* 2021; 11: 1–9.
 74. Wang H, Chen X, Li J, et al. Oxyresveratrol from mulberry (*Morus alba* L.) ameliorates post-inflammatory hyperpigmentation in vitro by anti-melanogenesis, inhibiting melanosome transfer, and providing photoprotection. *J Funct Foods*; 122. Epub ahead of print November 1, 2024. DOI: 10.1016/j.jff.2024.106557.
 75. Yang CY, Guo Y, Wu WJ, et al. UV-B-Induced Secretion of IL-1 β Promotes Melanogenesis by Upregulating TYR/TRP-1 Expression In Vitro. *Biomed Res Int*; 2022. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1155/2022/8230646.
 76. Yada Y, Higuchi K IG. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UV-B-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol*. 1999; 113(5):769-775.
 77. Regazzetti C, De Donatis GM, Ghorbel HH, et al. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin Receptor B activation. *Journal of Investigative Dermatology* 2015; 135: 3096–3104.
 78. Prasawang N, Sutjarit N, Sitthipunya A, et al. Inhibition of Tyrosinase and Melanogenesis by a White Mulberry Fruit Extract. 2025; 1–16.
 79. Kim H, Choi HR, Kim DS, Park KC. Topical hypopigmenting agents for pigmentary disorders and their mechanisms of action. *Ann Dermatol*. 2012;24(1):1-6. doi:10.5021/ad.2012.24.1.1.

