

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUNGA
TAPAK DARA (*Catharanthus roseus*) TERHADAP
EKSPRESI MITF DAN KADAR GP_x**

**Study Experimental Pada Mencit C57BL/6
Yang Dipapar Sinar UVB Subkronis**

Tesis

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



Magister Ilmu Biomedis

Lidya Wulandari

MBK2322010410

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK BUNGA
TAPAK DARA (*Catharanthus roseus*) TERHADAP
EKSPRESI *Microphthalmia-associated Transcription
Factor* (MITF) DAN KADAR *Glutathione
Peroxidase* (GPx)**

Study Experimental Pada Mencit C57BL/6
Yang Dipapar Sinar UVB Subkronis

disusun oleh:

Lidya Wulandari

MBK2322010410

Akan dipertahankan di depan Tim Penguji
November 2025

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. dr. Hadi Sarosa, M. Kes
NIK. 210.101.059

Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes
NIK. 0616116601

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B., FINACS
NIK. 210.113.160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar 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.



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Lidya Wulandari
Tempat, tanggal lahir : Tangerang, 23 Februari 1986
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN : lulus tahun 1997
2. SMPN : lulus tahun 2000
3. SMAN : lulus tahun 2003
4. FK : lulus tahun 2011
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA: 2023 – sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2018-sekarang : Wijaya platinum clinic

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H. Imam asyari ,SH
Ibu : Sintha L Tobing
2. Nama Suami : dr. Anandya Anton Atmojo Hadi Sp.A
3. Nama Anak : 1. Alya Queenita Anandya
2. M. Riffat Ardimas Anandya

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan hasil tesis yang berjudul “Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Bunga Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*) Terhadap Ekspresi MITF Dan Kadar GPx, Study Experimental Pada Mencit C57BL/6 Yang Dipapar Sinar Uvb Subkronis”. Tujuan laporan hasil tesis ini adalah untuk memenuhi syarat dalam mencapai derajat Magister Biomedik pada Program Studi Pasca Sarjana Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dalam proses penyusunan laporan hasil tesis ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak sehingga laporan hasil 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.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan arahan serta dukungan dalam penyusunan tesis ini.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan selaku penguji I yang telah memberikan dukungan dalam penyusunan tesis ini.

4. Dr. dr. Hadi Sarosa, M. Kes selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta motivasi selama penyusunan tesis ini.
5. Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta saran, penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku penguji II yang memberikan banyak perhatian, kritik, serta saran selama penyusunan tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E, Subsp.D.K.E, FINS DV, FAADV selaku penguji III yang memberikan banyak masukan, kritik, serta saran selama penyusunan tesis ini.
8. Orang tua, Suami dan anak tercinta yang telah banyak memberikan doa, semangat, dukungan materil maupun immateril sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.
9. Seluruh staf dan pengajar Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah banyak membantu selama penyusunan proposal 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, Maret 2025



Lidya Wulandari

DAFTAR ISI

TESIS.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR ISTILAH.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Orisinalitas Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	9
1.5.1 Manfaat Teoritis.....	9
1.5.2 Manfaat Praktis.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 MITF (<i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>)	10
2.2 <i>Glutathione peroxidase</i> (GPx)	17
2.3 <i>Catharanthus roseus</i>	20
2.4 Pengaruh gel ekstrak <i>Catharanthus roseus</i> terhadap ekspresi <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i> (MITF) dan kadar <i>Glutathione peroxidase</i> (GPx) pada jaringan kulit yang terpapar UVB sub kronis	24
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	29
3.1 Kerangka Teori	29
3.2 Kerangka Konsep.....	33
3.3 Hipotesis	33
BAB IV METODE PENELITIAN	34
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	34
4.1.1 Jenis Penelitian	34

4.1.2 Rancangan Penelitian.....	34
4.1.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	35
4.2 Besar Sampel	36
4.3 Teknik Sampling Penelitian.....	37
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	37
4.4.1 Variabel Penelitian.....	37
4.5 Definisi Operasional	37
4.6 Bahan atau Materi Penelitian	39
4.7 Peralatan.....	39
4.7.1 Alat.....	39
4.8 Cara Penelitian dan Alur kerja.....	40
4.8.1 Perolehan Ethical Clearance	40
4.8.2 Pembuatan Ekstrak <i>Catharanthus roseus</i>	40
4.8.3 Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak <i>Catharanthus roseus</i>	41
4.8.4 Persiapan Hewan Uji	42
4.8.5 Paparan UVB kronik.....	43
4.8.6 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit Mencit	44
4.8.7 Presedur pemeriksaan ekspresi MITF menggunakan Metode IHC	45
4.8.8 Prosedur Pemeriksaan kadar GPx menggunakan metode ELISA	46
4.9 Metode Analisis Data.....	47
4.10 Tempat dan Waktu Penelitian.....	48
4.11 Alur Penelitian	50
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	51
5.1 Hasil Penelitian.....	52
5.1.1 Ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit yang terpapar sinar UVB subkronis.....	52
5.1.2 Kadar <i>Glutathione Peroxidase</i> (GPx) pada serum darah mencit yang terpapar sinar UVB subkronis.....	58
5.2 PEMBAHASAN	61
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	69
6.1. Kesimpulan	69
6.2. Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN.....	80
Lampiran I. izin etik penelitian	80
Lampiran 2. Surat Keterangan STIFAR	81

Lampiran 3 Keterangan Penelitian.....	82
Lampiran 4. Hasil Analisis Kadar GPx.....	83
Lampiran 5. Hasil Analisis MITF dengan metode Imunohistokimia (IHK).....	84
Lampiran 6. Persiapan Bahan, Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Uji Mencit	86
a. Dokumentasi pengambilan dan pembuatan sediaan Bunga bunga tapak dara (<i>Catharanthus roseus</i>)	86
b. Dokumentasi Perlakuan Hewan Coba Mencit C57BL/6	88
Lampiran 7. Hasil Output SPSS.....	91



DAFTAR ISTILAH

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
APC	: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ASP	: <i>Agonist Stimulating Protein</i>
AXIN	: <i>Axis Inhibitor Protein</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
DOPA	: <i>Dihydroxyphenylalanine</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GSK-3 β	: <i>Glycogen Synthase Kinase-3 Beta</i>
GSSG	: <i>Glutathione Disulfide</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MEK	: <i>MAPK/ERK Kinase</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>
MSH	: <i>Melanocyte-Stimulating Hormone</i>
Nrf2	: <i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase / Protein Kinase B</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
RAF	: <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	: <i>Rat Sarcoma Virus Protein</i>

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SCF : *Stem Cell Factor*

TRP-1 : *Tyrosinase-Related Protein 1*

TRP-2 : *Tyrosinase-Related Protein 2*

UV : *Ultraviolet*

UVB : *Ultraviolet B*

α -MSH : *α -Melanocyte-Stimulating Hormone*



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur pengaturan produksi melanin.	25
Gambar 3.1 Alur Kerangka teori.....	32
Gambar 3.2 Alur kerangka konsep	33
Gambar 4.1 Skema Rancangan penelitian.	34
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	50
Gambar 5.2 Rata-rata Ekspresi MITF tiap kelompok.....	53
Gambar 5.1 Mikroskopis ekspresi MITF pada tiap kelompok perlakuan (kelompok kontrol normal (a), kelompok kontrol negatif (b), kelompok kontrol positif (c), kelompok perlakuan 1 gel ekstrak <i>Catharanthus roseus</i> dosis 15% (d), dan kelompok perlakuan 2 gel ekstrak <i>Catharanthus roseus</i> dosis 30% (e).....	56
Gambar 5.3 Rata-rata kadar GPx pada serum darah mencit tiap kelompok perlakuan	59

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Orisinalitas penelitian	5
Tabel 5.1 Uji Deskriptif, Normalitas, Homogenitas, dan Uji Beda antar kelompok dengan <i>Kruskal Wallis Test</i> terhadap ekspresi MITF	52
Tabel 5.2 Perbandingan antar dua kelompok dengan uji <i>Mann Whitney</i> pada Ekspresi MITF	54
Tabel 5.3 Uji Deskriptif, Normalitas, Homogenitas, dan Uji Beda antar kelompok dengan <i>One way Anova</i> terhadap kadar GPx	58
Tabel 5.4 Uji <i>Posh Hoc LSD</i> kadar GPx pada tiap kelompok	60



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan sinar ultraviolet B (UVB) meningkatkan stres oksidatif yang mengaktivasi faktor transkripsi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF). Pengaktifan mempengaruhi sel melanosit dan proses melanogenesis. Antioksidan alami seperti ekstrak bunga *Catharanthus roseus* (tapak dara) berpotensi mempengaruhi ekspresi MITF serta meningkatkan kadar enzim *Glutathione Peroxidase* (GPx) sebagai mekanisme protektif terhadap kerusakan oksidatif akibat paparan UVB. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak *Catharanthus roseus* terhadap ekspresi MITF dan kadar GPx pada kulit mencit C57BL/6 yang dipapar UVB subkronis.

Metode: Penelitian eksperimental ini menggunakan desain kelompok kontrol pasca-tes saja. Tiga puluh mencit C57BL/6 jantan diacak ke dalam lima kelompok (n=6): K1 (normal), K2 (kontrol negatif), K3 (kontrol positif, vitamin E), K4 (gel C. roseus 15%), dan K5 (gel C. roseus 30%). Paparan UVB dan aplikasi gel topikal dilakukan sekali sehari selama 14 hari. Ekspresi MITF dinilai melalui imunohistokimia, dan kadar GPx diukur dari serum menggunakan ELISA.

Hasil: Penelitian eksperimental dengan rancangan *post-test only control group design* yang dibagi lima kelompok: K1 (normal), K2 (kontrol negatif, basis gel), K3 (kontrol positif, vitamin E), K4 (gel ECR 15%), dan K5 (gel ECR 30%). Kadar GPx menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,001$): K1=10,66±0,85 ng/mL, K2=2,60±1,22 ng/mL, K3=3,70±1,00 ng/mL, K4=8,29±1,95 ng/mL, dan K5=9,15±0,91 ng/mL. Ekspresi MITF, juga berbeda signifikan ($p=0,003$): K1=27,47±3,62%, K2=31,82±8,11%, K3=51,07±8,16%, K4=34,49±7,91%, dan K5=40,49±3,74%.

Kesimpulan: Pemberian gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* meningkatkan kadar GPx dan ekspresi MITF secara signifikan pada kulit mencit yang terpapar UVB. Konsentrasi 30% menunjukkan efek antioksidan dan protektif paling optimal, mendekati kondisi fisiologis normal, sehingga berpotensi digunakan sebagai agen pencerah dan pelindung kulit alami.

Kata Kunci: *Catharanthus roseus*, MITF, GPx, UVB, hiperpigmentasi

ABSTRACT

Background: Ultraviolet B (UVB) exposure increases oxidative stress, which activates the Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF). This activation affects melanocyte function and the melanogenesis process. Natural antioxidants such as *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle) extract may influence MITF expression and elevate Glutathione Peroxidase (GPx) levels as a protective mechanism against UVB-induced oxidative damage. This study aimed to determine the effects of *Catharanthus roseus* extract gel on MITF expression and GPx levels in the skin of C57BL/6 mice subjected to subchronic UVB exposure.

Methods: This experimental study used a post-test only control group design. Thirty male C57BL/6 mice were randomized into five groups (n=6): K1 (normal), K2 (negative control), K3 (positive control, vitamin E), K4 (15% *C. roseus* gel), and K5 (30% *C. roseus* gel). UVB exposure and topical gel application were performed once daily for 14 days. MITF expression was assessed via immunohistochemistry, and GPx levels were measured from serum using ELISA.

Results: GPx levels showed significant differences among groups ($p=0.001$): K1=10.66±0.85 ng/mL, K2=2.60±1.22 ng/mL, K3=3.70±1.00 ng/mL, K4=8.29±1.95 ng/mL, and K5=9.15±0.91 ng/mL. MITF expression likewise differed significantly ($p=0.003$): K1=27.47±3.62%, K2=31.82±8.11%, K3=51.07±8.16%, K4=34.49±7.91%, and K5=40.49±3.74%.

Conclusion: Topical administration of *Catharanthus roseus* flower extract gel significantly increased GPx levels and MITF expression in UVB-exposed mouse skin. The 30% concentration demonstrated the most optimal antioxidant and protective effects, closely approaching normal physiological conditions, indicating its potential as a natural skin-brightening and photoprotective agent.

Keywords: *Catharanthus roseus*, MITF, GPx, UVB, hyperpigmentation

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) memicu pembentukan radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif pada kulit. Kondisi ini berperan dalam aktivasi jalur melanogenesis melalui peningkatan ekspresi *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), yang merupakan regulator utama dalam produksi melanin.¹ Akumulasi melanin secara berlebihan akan memicu munculnya hiperpigmentasi, yang ditandai dengan noda gelap, warna kulit tidak merata, dan tampilan kulit kusam.² Permasalahan hiperpigmentasi ini telah menjadi perhatian utama dalam bidang kosmetik karena berkaitan langsung dengan estetika dan kepercayaan diri.^{3,4} Meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap efek samping bahan kimia sintetis, mendorong pergeseran tren kosmetik ke arah penggunaan bahan alami atau herbal yang dinilai lebih aman, ramah kulit, dan minim toksisitas.⁵ Salah satu bahan alami yang potensial untuk dikembangkan sebagai agen pencerah kulit adalah ekstrak bunga *Catharanthus roseus* (tapak dara).^{6,7} Ekstrak *Catharanthus roseus* memiliki aktivitas antioksidan yang dapat membantu dalam mengurangi produksi melanin yang berlebihan dan mencegah hiperpigmentasi kulit.⁸

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) adalah faktor transkripsi utama yang mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis melanin,⁹ Ekspresi ini sangat penting dalam mengontrol jumlah dan aktivitas melanosit. Penghambatan ekspresi MITF dapat mengurangi sintesis melanin, sehingga

berpotensi menjadi target untuk agen pencerah kulit.¹⁰ Selain itu, enzim Glutathione peroxidase (GPx) juga mampu menurunkan aktivitas tirosinase, yaitu enzim kunci dalam proses pembentukan melanin. Dengan terhambatnya tirosinase, produksi melanin berkurang sehingga kondisi hiperpigmentasi dapat dicegah.¹¹ Mengalihkan sintesis melanin dari melanin gelap (*eumelanin*) ke melanin terang (*pheomelanin*), berperan penting dalam melindungi kulit dari efek merusak sinar UVB.^{9,12,13} Membantu meregenerasi antioksidan lain, seperti vitamin C dan E, ke bentuk aktifnya, memperkuat pertahanan antioksidan kulit secara keseluruhan. Penggunaan antioksidan dapat menjadi pendekatan yang efektif dalam mencegah atau mengatasi masalah pigmentasi.¹⁴

Catharanthus roseus atau tapak dara merupakan tanaman dengan berbagai manfaat kesehatan karena mengandung senyawa aktif yang bersifat antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. Alkaloid seperti vincristine dan vinblastine diketahui dapat menghambat proliferasi sel melanosit, penurunan jumlah melanosit ini berimplikasi pada berkurangnya produksi melanin yang dapat dimanfaatkan dalam terapi hiperpigmentasi kulit.^{15,16} Ekstrak *Catharanthus roseus* meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti *glutathione reductase* dan *glutathione synthetase*, yang berperan dalam regenerasi glutathione (GSH), melalui mekanisme tidak langsung, yaitu sebagai antioksidan endogenik yang mengaktifasi peningkatan ekspresi gen-gen antioksidan.¹⁷ Mekanisme ini membantu menjaga keseimbangan antioksidan dalam sel, mengurangi stres oksidatif, serta mencegah deplesi glutathione.⁶ Perlindungan yang diberikan oleh *Catharanthus roseus* terjadi melalui peningkatan sistem pertahanan antioksidan seluler, yang bekerja dengan

menetralkan ROS akibat paparan UVB, sehingga berkontribusi pada regenerasi kulit dan menghambat hiperpigmentasi, serta melindungi jaringan kulit dari kerusakan.^{18,19}

Catharanthus roseus merupakan tumbuhan yang memiliki senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, dan fenolik, yang diketahui memiliki aktivitas biologis, termasuk potensi dalam pengelolaan hiperpigmentasi. Flavonoid dalam *Catharanthus roseus* dapat menekan ekspresi *MITF* sehingga memengaruhi jalur MAPK dengan menghambat fosforilasi p38 MAPK atau ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), yang secara langsung berdampak pada stabilitas dan aktivitas MITF. Selain itu, ekstrak ini dapat memodulasi jalur cAMP yang melibatkan protein kinase A (PKA), berpotensi mengubah regulasi MITF melalui perubahan pada tingkat fosforilasi. Ekstrak *Catharanthus roseus* mengurangi pigmentasi kulit melalui penghambatan jalur sinyal melanogenesis, penurunan ekspresi MITF.²⁰

Beberapa penelitian awal menunjukkan potensi *Catharanthus roseus* sebagai agen pencerah kulit yang bekerja melalui mekanisme penghambatan enzim tirosinase dan regulasi faktor-faktor transkripsi yang terlibat dalam melanogenesis.⁶ Pemilihan bunga *Catharanthus roseus* sebagai alternatif menarik dalam kosmetik untuk mengobati hiperpigmentasi karena kandungan bioaktifnya yang dapat menurunkan ekspresi *MITF*, dan melawan stres oksidatif serta inflamasi, dengan penelitian dan pengembangan lebih lanjut, bunga ini dapat menjadi bahan utama dalam produk pencerah kulit yang alami, efektif, dan aman.¹⁵

Ekstrak *Catharanthus roseus* memiliki kandungan antioksidan yang kuat,²¹ antioksidan diketahui mendukung sintesis GPx, menjaga keseimbangan redoks, dan mengurangi stres oksidatif. Dengan menetralkan ROS akibat UVB, serta membantu regenerasi kulit, mencegah hiperpigmentasi, dan melindungi kulit dari kerusakan.^{22,23} Dari latar belakang yang sudah disusun, Belum ada laporan penelitian yang secara spesifik mengeksplorasi efektivitas ekstrak *Catharanthus roseus* terhadap ekspresi MITF dan kadar glutathione, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang menjadi dasar dalam penelitian ini dapat dinyatakan sebagai berikut:

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) dan kadar *Glutathione peroxidase* (GPx) pada jaringan kulit mencit C57BL/6 yang di paparkan sinar UVB subkronis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengevaluasi sejauh mana gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) memengaruhi ekspresi MITF serta kadar GPx pada jaringan kulit mencit yang mengalami paparan UVB secara subkronis.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit yang di papir sinar UVB subkronis.
2. Untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap kadar GPx pada jaringan kulit mencit yang di papir sinar UVB subkronis.

1.4 Orisinalitas Penelitian

Penelitian ini mengusulkan eksplorasi inovatif terhadap penggunaan gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) sebagai agen pencerah kulit, dengan fokus pada mekanisme molekuler melalui ekspresi MITF dan kadar GPx. Keunikan penelitian ini terletak pada pemanfaatan bunga *Catharanthus roseus*, tanaman yang lebih dikenal karena kandungan alkaloidnya dalam aplikasi farmakologis, untuk tujuan kosmetik yang relatif belum banyak diteliti. Formulasi gel yang digunakan menawarkan keunggulan dalam hal penetrasi kulit, stabilitas, dan kenyamanan aplikasi topikal. Dengan model uji pada jaringan kulit mencit, penelitian ini memberikan data praklinis yang kritis untuk mengevaluasi efektivitas dan keamanan, membuka jalan untuk pengembangan produk kosmetik berbasis bahan alami yang aman dan efektif.

Tabel 1.1 Orisinalitas penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian
1	Akhmad Al-Bari et al., 2023 ²⁴	Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara	<i>In vivo</i>	Krim ekstrak daun tapak dara efektif melindungi dari sinar UV-B, mengurangi

No	Peneliti, tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian
		(<i>Catharanthus roseus L.</i>) sebagai Tabir Surya		jumlah bintik eritema, menunjukkan potensi sebagai tabir surya alami.
2	Leny Situmorang TNK, Siagian R, Hafiz I, Iskandar B. 2023. ¹⁵	<i>Ointment Formulation of Tapak Dara (Catharanthus roseus (L.) G. Don) Flower Ethanol Extract and its Activity in Burn-Healing.</i>	<i>In vivo</i>	Ekstrak etanol bunga <i>C. roseus</i> memiliki aktivitas yang baik menyembuhkan luka bakar pada mencitputih jantan. Konsentrasi yang paling efektif adalah salep yang mengandung 15% dalam penyembuhan luka bakar. ¹⁵
3	Amalia MR, Subchan P. (2023). ²⁵	<i>Effect of Petai Skin Extract Gel Administration on MITF Gene Expression and Melanin Count (in Vivo Experimental Study on Hyperpigmented Wistar Mice Exposed to UVB Exposed Hyperpigmentation).</i>	<i>In vivo</i>	Aplikasi gel ekstrak kulit petai terbukti mampu menurunkan ekspresi gen MITF serta mengurangi jumlah melanin pada tikus dengan kondisi hiperpigmentasi yang mendapatkan paparan sinar UVB. ²⁵
4	Santhi AAWK., 2023. ²⁶	Pengaruh gel ekstrak daun tapak dara (<i>Catharanthus roseus</i>) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan pasca luka insisi gingiva marmut(<i>Rattus norvegicus</i>).	<i>In vivo</i>	Spray gel tabir surya dari daun tapak dara stabil dan memenuhi syarat. Nilai SPF terbaik terdapat pada F3 dengan kosentrasi 6% dengan kategori proteksi ultra dan kenaikan nilai SPF dipengaruhi oleh penambahan konsentrasi ekstrak.

No	Peneliti, tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian
5	A M Satish et al., 2021. ²⁷	<i>Evaluation of Wound Healing Activity of Catharanthus Roseus Aqueous Extract in Adult Albino Rats</i>	<i>In vivo</i>	Ekstrak <i>Catharanthus roseus</i> dapat meningkatkan kekuatan jaringan, mempercepat epitelisasi, dan meningkatkan sintesis kolagen pada berbagai model luka pada mencit albino, setara dengan obat standar sucralfate.

Penelitian Akhmad *et al.*, menilai khasiat krim ekstrak *Catharanthus roseus* sebagai tabir surya alami untuk mencegah eritema pada tikus. Ekstrak dibuat menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% dalam rasio 1:4. Tiga formulasi krim tabir surya dibuat dengan menggunakan konsentrasi ekstrak *Catharanthus roseus* masing-masing 1%, 1,5%, dan 3%. Formulasi F0 tidak mengandung ekstrak. Krim kemudian diuji pada kulit tikus dan dipaparkan pada sinar UV-B selama delapan jam.²⁴

Leny *et al.*, memformulasikan sediaan salep ekstrak etanol bunga *Catharanthus roseus* dan mengetahui karakteristik fisiknya seperti uji organoleptik, homogenitas, nilai pH, daya sebar, dan uji stabilitas sediaan serta menguji aktivitasnya sebagai penyembuh luka bakar pada tikus putih jantan.¹⁵

Amalia *et al.*, menyatakan pemberian ekstrak kulit petai pada konsentrasi 10% maupun 20% mampu menurunkan ekspresi gen MITF serta mengurangi jumlah melanin secara signifikan pada tikus jantan Wistar yang mengalami hiperpigmentasi akibat paparan sinar UVB.²⁵

Santhi *et al.* melakukan penelitian menggunakan ekstrak daun *Catharanthus roseus* terhadap jumlah fibroblas dalam proses penyembuhan luka pada mukosa oral dilakukan dengan membuat luka melalui insisi pada mukosa labial tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Pada kelompok kontrol, luka diberi aplikasi akuades, sedangkan pada kelompok perlakuan luka diolesi ekstrak *Catharanthus roseus* dengan variasi konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Pada hari ke-7, tikus dieutanasia, kemudian jaringan mukosa labial diambil untuk dilakukan pengamatan histologis.²⁶

Satish *et al.*, mengevaluasi potensi penyembuhan luka ekstrak air *Catharanthus roseus* menggunakan model luka sayatan, eksisi, dan ruang mati pada tikus albino jantan yang sehat. Untuk menilai hal ini, kekuatan putus jaringan untuk model luka sayatan, persentase epitelisasi dan periode epitelisasi lengkap untuk model luka eksisi dan kekuatan putus granuloma, berat kering, dan kandungan hidrokortison untuk model luka ruang mati dievaluasi setelah pengobatan ekstrak dibandingkan dengan obat standar sukralfat.²⁷

Berbeda dengan beberapa penelitian yang akan dilakukan menggunakan gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) pada jaringan kulit mencit yang mengalami hiperpigmentasi menggunakan dosis 15% dan 30% kemudian dilakukan analisis ekspresi MITF dan kadar glutathione pada jaringan kulit yang di papir sinar UVB subkronis selama 14 hari.

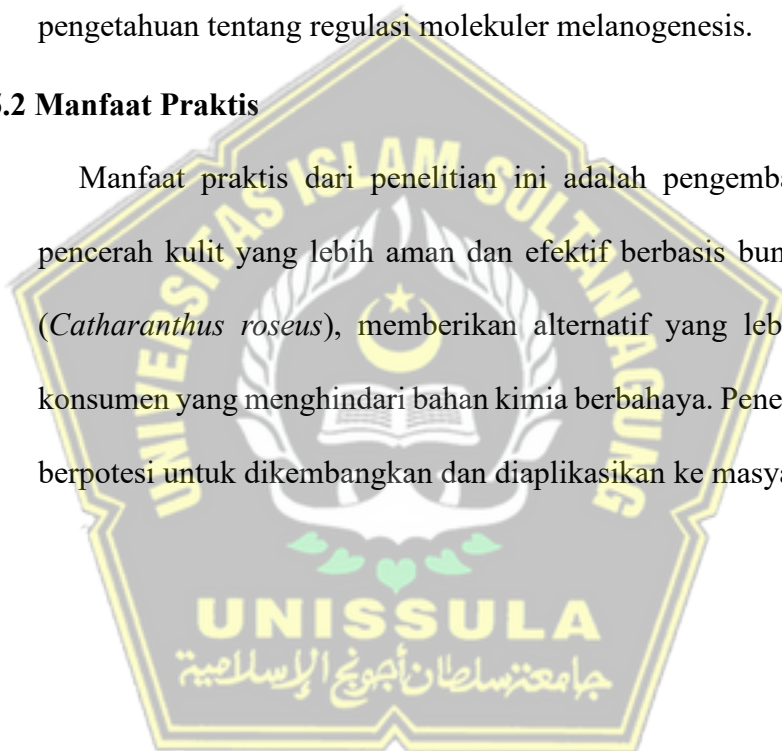
1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini akan memberikan wawasan lebih dalam tentang mekanisme bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) sebagai agen pencerah kulit. Dengan memahami bagaimana ekstrak tanaman ini memengaruhi ekspresi MITF dan kadar GPx, peneliti dapat memperluas pengetahuan tentang regulasi molekuler melanogenesis.

1.5.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah pengembangan produk pencerah kulit yang lebih aman dan efektif berbasis bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*), memberikan alternatif yang lebih aman bagi konsumen yang menghindari bahan kimia berbahaya. Penelitian ini dapat berpotensi untuk dikembangkan dan diaplikasikan ke masyarakat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*)

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) adalah faktor transkripsi yang memainkan peran sentral dalam regulasi pigmentasi kulit.²⁸ MITF mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi melanin, pigmen yang memberikan warna pada kulit, rambut, dan mata. MITF berperan sebagai pengatur utama dalam diferensiasi, perkembangan, dan fungsi melanosit, sel-sel yang memproduksi melanin.²⁹ Sebagai faktor transkripsi, MITF mengikat DNA pada promotor gen targetnya dan mengaktifkan transkripsi gen-gen kunci seperti tirosinase, TRP-1 (*tyrosinase-related protein 1*), dan TRP-2 (*tyrosinase-related protein 2*), yang semuanya esensial untuk biosintesis melanin.³⁰

Paparan oksidan pada tingkat ringan hingga menengah membentuk kondisi subkronis atau *sub-damage exposure* yang tidak menimbulkan kerusakan struktural permanen. Biologi stres mendefinisikan kondisi ini sebagai bentuk hormesis yang memicu respons adaptif untuk memperkuat fungsi sel.³¹ Melanosit merespons stres oksidatif ringan sebagai sinyal fisiologis yang menandakan kebutuhan peningkatan perlindungan pigmen. Respons tersebut bergantung pada kemampuan sel membaca akumulasi ROS tingkat rendah sebagai pemicu aktivasi jalur pensinyalan adaptif.³²

ROS pada kadar moderat mengaktifkan jalur MAPK/ERK yang memfosforilasi MITF pada residu Ser73. Fosforilasi ini meningkatkan aktivitas transkripsional MITF dan memperkuat interaksinya dengan ko-aktivator

p300/CBP sehingga ekspresi gen melanogenik meningkat.³³ ROS juga mengaktivasi jalur p38 MAPK yang berperan dalam stabilisasi protein MITF dan penguatan diferensiasi melanosit. Aktivasi p38 mendukung peningkatan transkripsi MITF serta kapasitas melanogenesis secara keseluruhan.³³

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) teraktivasi mengikat elemen M-box dan E-box pada promotor *tyrosinase*, *TRP-1 (TYRP1)*, dan *TRP-2 (DCT)* yang berfungsi sebagai komponen kunci biosintesis eumelanin.³⁴ Produksi melanin yang meningkat memberikan kontribusi sebagai antioksidan endogen yang mampu menetralkan ROS dan menjaga integritas seluler. Mekanisme ini membentuk rangkaian adaptasi pigmentasi yang memperlihatkan hubungan fungsional antara ROS moderat, aktivitas MITF, dan penguatan kapasitas perlindungan pigmen.³⁵

Stres oksidatif moderat meningkatkan aktivitas MITF melalui modulasi sinyal redoks intraseluler. Paparan oksidan ringan menghasilkan akumulasi ROS yang cukup untuk mengaktifkan jalur MAPK/ERK, p38, atau sistem thioredoxin, selanjutnya memfasilitasi fosforilasi dan stabilisasi MITF.³⁶ Aktivasi ini memperkuat kemampuan MITF dalam menstimulasi ekspresi tirosinase, TRP-1, dan TRP-2 sehingga proses melanogenesis meningkat dalam rangka mempertahankan integritas seluler. Melanosit memanfaatkan peningkatan ROS moderat sebagai sinyal adaptif untuk memperkuat kapasitas perlindungan terhadap stres oksidatif melalui peningkatan produksi melanin, sementara tingkat ROS yang tidak melebihi ambang kerusakan memungkinkan

sel melakukan respons adaptif tanpa mengalami apoptosis atau disfungsi struktural.³⁷

Fenomena tersebut konsisten dengan konsep subkronis yang menempatkan paparan ringan di bawah ambang kerusakan sebagai pemicu adaptasi biologis. Paparan oksidan dengan intensitas atau durasi minimal menghasilkan respons pigmentasi yang meningkat melalui amplifikasi aktivitas MITF dan peningkatan biosintesis melanin. Sistem pigmentasi berfungsi sebagai mekanisme proteksi endogen, sehingga peningkatan pigmentasi yang terjadi pada konteks stres oksidatif moderat mencerminkan strategi kulit untuk mempertahankan stabilitas redoks dan melindungi jaringan dari paparan oksidatif yang berulang.³⁶

Melanogenesis adalah proses biosintesis melanin yang terjadi di dalam melanosit. MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) berfungsi sebagai pengatur utama dalam proses ini dengan menginduksi ekspresi enzim-enzim kunci yang diperlukan untuk sintesis melanin. Tirosinase adalah enzim pertama dan terpenting dalam jalur melanogenesis, mengkatalisis konversi tirosin menjadi DOPA dan kemudian menjadi DOPAquinone.²⁸ MITF juga mengatur ekspresi TRP-1 dan TRP-2, yang bertanggung jawab atas tahap-tahap berikutnya dalam jalur sintesis melanin. Aktivasi MITF sendiri diatur oleh berbagai sinyal, termasuk sinyal dari reseptor melanocortin 1 (MC1R) dan jalur MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), menginduksi fosforilasi MITF, meningkatkan stabilitas dan aktivitas transkripsionalnya.³⁸

Ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor genetik dan lingkungan. Faktor genetik termasuk mutasi dalam gen MITF itu sendiri atau dalam gen yang mengatur jalur sinyal yang mengaktifkan MITF.³⁹ Faktor lingkungan yang signifikan meliputi paparan radiasi ultraviolet (UV), yang dapat meningkatkan ekspresi MITF melalui jalur p53 dan jalur MAPK.²⁸ Hormon seperti hormon *melanosit-stimulating* (MSH) juga berperan dalam meningkatkan ekspresi MITF melalui aktivasi reseptor MC1R. Stres oksidatif dan faktor-faktor inflamasi juga dapat memodulasi ekspresi MITF, baik secara langsung maupun melalui jalur sinyal yang terlibat dalam respons seluler terhadap stres.⁴⁰

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) memiliki relevansi yang besar dalam proses pencerahan kulit karena kemampuannya untuk mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam sintesis melanin. Inhibisi MITF dapat mengurangi produksi melanin, sehingga mencerahkan warna kulit. Bahan-bahan pencerah kulit sering kali menargetkan jalur MITF atau enzim-enzim yang diatur oleh MITF, seperti tirosinase.⁴¹ Misalnya, bahan aktif seperti arbutin, *kojic acid*, dan asam askorbat telah diketahui mengurangi aktivitas tirosinase dan menurunkan ekspresi MITF, menghasilkan efek pencerahan.⁴²

Radiasi UV merupakan salah satu faktor lingkungan yang paling signifikan yang mempengaruhi ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*). Paparan UV menginduksi kerusakan DNA dalam sel kulit, yang kemudian mengaktifkan jalur sinyal yang mengarah pada peningkatan ekspresi MITF.²⁸ Salah satu jalur utama yang terlibat adalah jalur

p53, di mana protein p53 yang diaktifkan oleh kerusakan DNA menginduksi ekspresi MITF untuk meningkatkan produksi melanin sebagai respons protektif terhadap radiasi UV. Selain itu, radiasi UV juga mengaktifkan jalur MAPK dan jalur cAMP, yang keduanya berkontribusi pada stabilisasi dan aktivasi MITF.

Hormon MSH adalah hormon yang diproduksi oleh kelenjar pituitari yang berperan dalam regulasi pigmentasi kulit.⁴³ MSH bekerja dengan mengikat reseptor melanocortin 1 (MC1R) pada permukaan melanosit, yang kemudian mengaktifkan jalur cAMP. Peningkatan kadar cAMP mengarah pada aktivasi protein kinase A (PKA), yang pada akhirnya meningkatkan fosforilasi dan aktivasi MITF. Aktivasi MITF ini mengarah pada peningkatan ekspresi enzim-enzim melanogenesis dan produksi melanin. Oleh karena itu, hormon MSH adalah salah satu faktor endogen utama yang mengatur ekspresi MITF dan pigmentasi kulit.⁴⁴

Stres oksidatif yang disebabkan oleh akumulasi radikal bebas dan *reaktif oksigen spesies* (ROS), dapat mempengaruhi ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*). Stres oksidatif dapat memodulasi jalur sinyal intraseluler seperti jalur MAPK dan jalur PI3K/AKT, yang dapat meningkatkan atau menurunkan ekspresi MITF tergantung pada konteks seluler dan tingkat stres oksidatif. Misalnya, stres oksidatif moderat dapat menginduksi ekspresi MITF sebagai bagian dari respons seluler adaptif untuk melindungi melanosit dari kerusakan lebih lanjut. Namun, stres oksidatif yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan seluler dan menurunkan ekspresi MITF melalui mekanisme yang melibatkan p53 dan faktor transkripsi lainnya.⁴⁵

Faktor genetik memainkan peran penting dalam menentukan tingkat ekspresi dan aktivitas MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*). Polimorfisme dan mutasi dalam gen MITF dapat mempengaruhi fungsinya sebagai faktor transkripsi. Misalnya, mutasi yang mengurangi afinitas MITF untuk DNA atau mengganggu interaksi dengan protein ko-regulator dapat menurunkan ekspresi gen target seperti tirosinase.⁴⁶ Mutasi dalam gen-gen yang mengatur jalur sinyal yang mengaktifkan MITF, seperti MC1R atau komponen-komponen jalur MAPK, juga dapat mempengaruhi ekspresi dan aktivitas MITF. Variabilitas genetik ini dapat menjelaskan perbedaan dalam pigmentasi kulit dan respons terhadap agen pencerah kulit di antara individu.

MITF berperan sebagai target terapeutik yang menjanjikan untuk pengembangan agen pencerah kulit. Penghambatan terhadap ekspresi atau aktivitas MITF dapat menurunkan produksi melanin secara efektif. Berbagai senyawa telah teridentifikasi mampu menekan ekspresi MITF atau menghambat fungsinya. Inhibitor jalur MAPK seperti U0126, misalnya, menunjukkan kemampuan menurunkan ekspresi MITF dan mengurangi pembentukan melanin. Pengembangan agen yang lebih spesifik dan efektif yang menargetkan MITF berpotensi memberikan solusi baru bagi masalah hiperpigmentasi maupun kebutuhan estetika kulit.⁴⁷

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) merupakan sebuah faktor transkripsi yang memegang peranan sentral dalam mengatur perkembangan sekaligus fungsi berbagai jenis sel, termasuk melanosit—sel yang bertanggung jawab dalam pembentukan melanin pada kulit. Peran MITF

terutama berkaitan dengan pengendalian ekspresi sejumlah gen penting yang terlibat dalam proses biosintesis melanin. Di antaranya adalah gen yang mengode enzim tirosinase, serta protein terkait tirosinase seperti TRP-1 (tyrosinase-related protein 1) dan TRP-2 (tyrosinase-related protein 2), yang keseluruhannya berkontribusi dalam tahapan pembentukan pigmen melanin.⁴⁸

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) mengikat promotor dari gen-gen target yang terlibat dalam sintesis melanin, termasuk tirosinase, TRP-1, dan TRP-2. Dengan meningkatkan ekspresi gen-gen ini, MITF secara langsung mempengaruhi jumlah melanin yang diproduksi oleh melanosit. MITF juga berperan dalam diferensiasi melanosit dari prekursor sel punca. Tanpa MITF, melanosit tidak dapat berkembang dengan baik, yang mengakibatkan gangguan dalam produksi melanin.⁴⁹

MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) berperan dalam memastikan kelangsungan hidup dan proliferasi melanosit. Fungsi ini penting untuk mempertahankan populasi melanosit yang cukup untuk menghasilkan pigmen kulit yang normal.⁵⁰ Pengukuran ekspresi MITF dalam penelitian ini dilakukan untuk memahami bagaimana ekstrak *Catharanthus roseus* mempengaruhi regulasi molekuler dari sintesis melanin. Dengan mengetahui apakah ekstrak ini dapat mengurangi ekspresi MITF, kita dapat mengidentifikasi mekanisme potensial dari efek pencerahannya. MITF merupakan sebuah faktor transkripsi yang memiliki peran penting dalam mengatur perkembangan serta fungsi sejumlah tipe sel, termasuk melanosit yang merupakan sel yang berperan dalam menghasilkan pigmen melanin pada kulit.

Faktor ini mengontrol ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam proses biosintesis melanin, di antaranya gen pengode enzim tirosinase serta protein terkait tirosinase seperti TRP-1 (tyrosinase-related protein 1) dan TRP-2 (tyrosinase-related protein 2).⁴⁸

2.2 *Glutathione peroxidase (GPx)*

Glutathione peroxidase (GPx) merupakan enzim antioksidan penting yang berperan dalam menjaga keseimbangan redoks sel dengan mereduksi senyawa peroksida seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan lipid peroksida menjadi air dan alkohol yang tidak berbahaya. Proses ini berlangsung melalui reaksi dengan glutathione tereduksi (GSH) sebagai donor elektron utama. Aktivitas GPx sangat krusial karena membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang dipicu oleh paparan sinar ultraviolet (UV), polutan, dan proses metabolik.⁵¹ Paparan sinar UVB secara subkronis diketahui dapat meningkatkan produksi ROS di dalam jaringan kulit. Akumulasi ROS ini menyebabkan stres oksidatif yang berdampak pada kerusakan protein, lipid membran, serta materi genetik, dan pada akhirnya mempercepat penuaan kulit serta memicu berbagai respon inflamasi. Salah satu indikator biokimia yang dapat digunakan untuk menilai tingkat stres oksidatif adalah kadar enzim GPx. Penurunan kadar GPx umumnya mencerminkan penurunan kapasitas antioksidan endogen, sedangkan peningkatan kadar GPx dapat menunjukkan adanya respon protektif terhadap stres oksidatif.^{51,52}

Dalam jaringan kulit, GPx berfungsi melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet (UV), polusi, dan stres

lingkungan lainnya. Aktivitas GPx yang optimal membantu mencegah kerusakan protein, lipid membran, dan DNA yang berkontribusi pada proses penuaan dini dan gangguan pigmentasi kulit.⁵³ GPx menghambat produksi melanin di kulit dengan inhibisi langsung enzim tirosinase, enzim kunci dalam melanogenesis yang mengubah L-tirosin menjadi melanin. GSH berinteraksi dengan ion tembaga (Cu^{2+}) pada situs aktif tirosinase, sehingga menurunkan aktivitas enzim ini. Berperan sebagai kofaktor inhibitor yang mengganggu akses tirosinase terhadap substratnya. Selain menghambat tirosinase, GSH juga mengubah jalur produksi melanin dari eumelanin (coklat-hitam) menjadi pheomelanin (kuning-merah) melalui regulasi cysteine-dopaquinone pathway. GSH berikatan dengan dopaquinone, mencegah pembentukan eumelanin, dan mendorong reaksi dengan L-cysteine untuk menghasilkan pheomelanin yang lebih terang. Mekanisme lainnya adalah modulasi faktor transkripsi MITF, yang berperan dalam regulasi ekspresi tirosinase dan enzim melanogenesis lainnya. Glutathione menekan ekspresi MITF melalui downregulasi sinyal CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*), yang pada akhirnya mengurangi sintesis tirosinase dan produksi melanin. Selain itu, glutathione juga berfungsi sebagai antioksidan yang menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat paparan UV, yang diketahui dapat mengaktifasi jalur p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) yang merangsang melanogenesis. Dengan menekan stres oksidatif, glutathione membantu mencegah hiperpigmentasi yang disebabkan oleh inflamasi atau kerusakan UV. Kombinasi mekanisme ini menjadikan GPx

sebagai agen pencerah kulit yang efektif dengan efek perlindungan terhadap paparan lingkungan yang merangsang produksi melanin berlebih.^{11,14}

Glutathione peroxidase (GPx) merupakan salah satu enzim antioksidan utama yang berfungsi melindungi kulit dari stres oksidatif. Dengan kemampuannya menurunkan akumulasi radikal bebas, enzim ini berkontribusi dalam mengurangi terjadinya hiperpigmentasi dan munculnya noda gelap pada kulit, sehingga turut mendukung tampilan kulit yang lebih cerah.. Dengan menetralkan radikal bebas dan peroksida, GPx melindungi sel-sel kulit dari kerusakan akibat paparan sinar UV dan polusi. Aktivitas antioksidan GPx juga mendukung regenerasi sel, mengurangi peradangan, serta membantu menjaga integritas struktur kolagen dan elastin yang penting untuk kekencangan dan elastisitas kulit.⁵⁴

Beberapa tanaman herbal mengandung senyawa bioaktif seperti polifenol, flavonoid, dan alkaloid yang mampu mengaktifasi jalur pensinyalan antioksidan endogen, seperti jalur Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).⁵⁵ Aktivasi jalur ini dapat meningkatkan ekspresi enzim-enzim antioksidan, termasuk *glutathione peroxidase* (GPx), senyawa alami dari tanaman tidak secara langsung menambah kadar GPx, tetapi merangsang mekanisme pertahanan tubuh untuk meningkatkan produksi GPx. Beberapa senyawa tanaman juga diketahui dapat menghambat tirosinase, menekan ekspresi MITF, dan mengubah rasio eumelanin-pheomelanin, sehingga memberikan efek perlindungan sekaligus pencerahan pada kulit.⁵⁶ Kombinasi efek antioksidan dan antimelanogenesis ini membantu mencegah kerusakan kulit akibat stres

oksidatif, paparan sinar UVB, dan polusi, serta mendukung peran kulit sebagai bagian dari sistem imun bawaan tubuh. Tanaman herbal menjadi pilihan perawatan kulit alami yang mendukung mekanisme protektif tubuh secara fisiologis dan berkelanjutan.⁵⁷

Glutathione peroxidase (GPx) juga berperan dalam mencegah kerusakan DNA akibat paparan UVB, yang bisa menyebabkan mutasi atau bahkan kanker kulit. Mengurangi kerusakan DNA dan mengurangi peradangan pada kulit, GPx mendukung proses penyembuhan dan regenerasi kulit, mempercepat pembentukan sel kulit baru. GPx juga menghambat aktivitas tirosinase, enzim utama dalam sintesis melanin, sehingga dapat mengurangi produksi melanin yang berlebihan dan mencegah hiperpigmentasi. GPx tidak hanya berfungsi sebagai pelindung kulit, tetapi juga mendukung pencerahan kulit dan menjaga kekenyalan serta elastisitasnya.⁵⁴

2.3 *Catharanthus roseus*

Catharanthus roseus yang sering dikenal sebagai tapak dara, merupakan tanaman dengan komponen bioaktif yang beragam dan memiliki aplikasi terapeutik yang luas. Salah satu komponen bioaktif utama dari tanaman ini adalah alkaloid, terutama vincristine dan vinblastine, yang telah dikenal luas karena kemampuannya dalam pengobatan kanker. Selain alkaloid, *Catharanthus roseus* juga mengandung terpenoid, flavonoid, dan glikosida. Senyawa-senyawa ini memberikan tanaman tersebut kemampuan untuk menghasilkan efek

farmakologis yang signifikan, termasuk sifat antiinflamasi, antioksidan, dan antimikroba. Flavonoid dalam tanaman ini, seperti quercetin dan kaempferol, berfungsi sebagai antioksidan yang kuat, melindungi sel-sel kulit dari kerusakan oksidatif dan peradangan.⁵⁸

Catharanthus roseus telah menunjukkan potensi yang menjanjikan sebagai bahan aktif dalam produk perawatan kulit. Penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi berbagai aplikasi tanaman ini, dari efek antiinflamasi hingga manfaat pencerahan kulit. Ekstrak *Catharanthus roseus* diketahui memiliki kemampuan untuk mengurangi peradangan dan meredakan kondisi kulit yang sensitif, berkat sifat antiinflamasi dan antioksidannya. Studi-studi ini juga mengindikasikan bahwa ekstrak *Catharanthus roseus* dapat memperbaiki kesehatan kulit secara keseluruhan dengan mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan regenerasi sel.⁵⁹ Dengan menghambat tirosinase, *Catharanthus roseus* dapat mengurangi produksi melanin, yang dapat mencerahkan warna kulit dan mengatasi hiperpigmentasi. Salah satu senyawa utama yang berkontribusi terhadap efek ini adalah alkaloid vinca, seperti vincristine, vinblastine, ajmalicine, dan serpentine. Alkaloid ini telah diketahui memiliki aktivitas biologis yang luas, termasuk sifat antioksidan dan penghambatan enzim yang berperan dalam metabolisme seluler. Selain alkaloid, *Catharanthus roseus* juga mengandung flavonoid, saponin, dan fenolik, yang memiliki efek antioksidan dan mampu mengurangi stres oksidatif akibat paparan UVB. Beberapa flavonoid dalam tanaman ini dapat berinteraksi dengan ion tembaga

(Cu²⁺) pada situs aktif tirosinase, sehingga menghambat konversi L-tirosin menjadi L-DOPA dan pada akhirnya mengurangi produksi melanin.⁶⁰

Salah satu alasan utama mengapa *Catharanthus roseus* dianggap berpotensi sebagai *whitening agent* adalah kandungan antioksidannya yang tinggi. Tanaman ini kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan terpenoid yang memiliki kemampuan antioksidan kuat. Antioksidan ini berperan penting dalam melindungi kulit dari kerusakan akibat radikal bebas dan paparan sinar UV, yang merupakan penyebab utama hiperpigmentasi dan penuaan dini kulit. Dengan melindungi kulit dari kerusakan oksidatif, *Catharanthus roseus* dapat membantu mempertahankan kecerahan dan kesehatan kulit secara alami.⁶¹

Enzim tirosinase merupakan komponen utama dalam proses pembentukan melanin, yaitu pigmen yang menentukan warna kulit, rambut, dan mata. Ketika produksi melanin berlangsung secara berlebihan, kondisi tersebut dapat memunculkan hiperpigmentasi berupa noda gelap, bintik-bintik, ataupun ketidakseimbangan warna kulit. Dengan kemampuan untuk menekan aktivitas tirosinase, ekstrak *Catharanthus roseus* berpotensi membantu menurunkan produksi melanin yang berlebih, sehingga dapat berkontribusi pada efek pencerahan kulit serta pengurangan tampilan noda hitam.

Catharanthus roseus juga diketahui memiliki sifat anti-inflamasi yang kuat. Peradangan pada kulit sering kali terkait dengan berbagai masalah kulit, termasuk hiperpigmentasi pasca-inflamasi yang dapat menyebabkan noda gelap yang sulit dihilangkan. Sifat anti-inflamasi dari *Catharanthus roseus* dapat

membantu meredakan peradangan pada kulit, sehingga berpotensi mencegah dan mengurangi hiperpigmentasi yang disebabkan oleh peradangan.

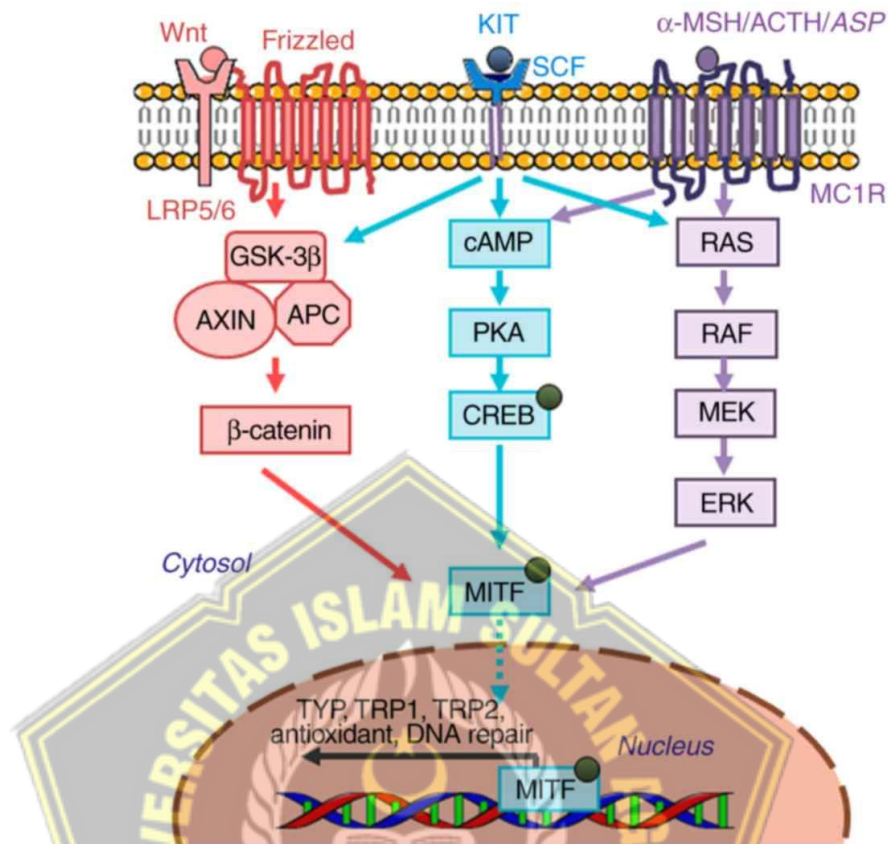
Vitamin C (asam askorbat) berperan sebagai agen pencerah kulit dengan menghambat enzim tirosinase, melalui reduksi ion tembaga (Cu^{2+}), sehingga menghambat konversi L-tirosin menjadi melanin. Selain itu, vitamin C menekan ekspresi faktor transkripsi MITF, yang bertanggung jawab atas regulasi tirosinase dan enzim lain yang mendukung produksi melanin, sehingga jumlah melanin dalam melanosit berkurang. Vitamin C juga berkontribusi dalam meningkatkan kadar glutathion (GSH) dalam sel, yang tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan tetapi juga menggeser produksi melanin dari eumelanin (coklat-hitam) menjadi pheomelanin (kuning-merah), yang lebih terang. Lebih lanjut, vitamin C berperan dalam sintesis kolagen dengan mengaktifkan enzim prolyl dan lysyl hydroxylase, yang diperlukan untuk stabilisasi dan perakitan serat kolagen, sehingga membantu regenerasi kulit dan memperbaiki hiperpigmentasi akibat penuaan atau paparan UV. Sebagai antioksidan kuat, vitamin C juga melindungi kulit dari kerusakan akibat sinar UV dengan menetralkan ROS, menghambat jalur MAPK yang menginduksi produksi melanin, serta mencegah peradangan yang dapat memicu hiperpigmentasi.⁶²

Catharanthus roseus juga memberikan manfaat tambahan untuk kesehatan kulit, seperti memperbaiki elastisitas dan mengurangi tanda-tanda penuaan. Penelitian menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak tanaman ini dapat meningkatkan sintesis kolagen dan elastin, yang berperan penting dalam menjaga kekencangan dan elastisitas kulit. Ini menjadikannya pilihan

menarik untuk formulasi produk anti-penuaan dan perawatan kulit yang menyeluruh. *Catharanthus roseus* terbukti efektif dan aman sebagai agen pencerah, tanaman ini dapat menjadi bahan baku yang sangat berharga bagi industri kosmetik. Ini tidak hanya akan memberikan alternatif yang lebih aman dan alami bagi konsumen tetapi juga membuka peluang ekonomi bagi petani yang menanam tanaman ini. Pengembangan produk berbasis *Catharanthus roseus* dapat mendukung ekonomi lokal dan memberikan nilai tambah pada produk herbal lokal.^{63,64}

2.4 Pengaruh gel ekstrak *Catharanthus roseus* terhadap ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) dan kadar *Glutathione peroxidase* (GPx) pada jaringan kulit yang terpapar UVB sub kronis

Ekstrak bunga *Catharanthus roseus* mempengaruhi ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) melalui berbagai jalur molekuler yang kompleks. Ekstrak bunga *Catharanthus roseus* memodulasi jalur yang mempengaruhi ekspresi MITF, seperti jalur MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) dan jalur cAMP (*cyclic AMP*). Komponen bioaktif dalam ekstrak seperti flavonoid dan terpenoid dapat memengaruhi jalur MAPK dengan menghambat fosforilasi p38 MAPK atau ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), yang berdampak pada aktivitas MITF. Memodulasi jalur cAMP yang melibatkan protein kinase A (PKA), mengubah regulasi MITF melalui perubahan pada tingkat fosforilasi.



Gambar 2.1 Jalur pengaturan produksi melanin.⁶⁵

Pengaturan produksi melanin pada regulasi MITF. Jalur Wnt/Frizzled dimulai dengan pengikatan Wnt pada reseptor Frizzled dan koreseptor LRP5/6, yang menghambat kompleks GSK-3 β , AXIN, dan APC. Penghambatan ini menyebabkan akumulasi β -catenin yang berpindah ke nukleus untuk mengaktifkan ekspresi gen termasuk MITF. Jalur KIT/SCF melibatkan pengikatan SCF (*Stem Cell Factor*) pada reseptor KIT, yang kemudian mengaktifkan jalur sinyal cAMP, PKA, dan CREB, sehingga meningkatkan ekspresi MITF. Jalur α -MSH/MC1R dimulai dengan pengikatan α -MSH (α -*Melanocyte-Stimulating Hormone*), ACTH (*Adrenocorticotrophic Hormone*),

atau ASP (*Agonist Stimulating Protein*) pada reseptor MC1R, mengaktifkan jalur RAS/RAF/MEK/ERK yang juga meningkatkan aktivitas transkripsi MITF.⁶⁵

Senyawa-senyawa aktif seperti alkaloid vincristine dan flavonoid dari tanaman ini telah terbukti memiliki efek penghambat yang signifikan.⁶⁶ Ekstrak bunga *Catharanthus roseus* juga mempengaruhi sintesis dan degradasi melanin dengan cara yang berlapis. Menghambat aktivitas tirosinase, mengurangi produksi melanin di melanosit, yang dapat mengarah pada penurunan konsentrasi melanin di epidermis.⁶ Senyawa aktif dalam ekstrak mempengaruhi proses degradasi melanin melalui modulasi aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam penghancuran melanin. Penurunan sintesis melanin yang terjadi akibat penghambatan tirosinase berkontribusi pada efek pencerahan kulit yang diamati dalam berbagai studi. Salah satu contohnya studi Aplikasi gel bunga ekstrak *Catharanthus roseus* dengan penyerapan lebih efisien, sensasi ringan dan tidak berminyak, distribusi bahan aktif yang merata, efek pendinginan untuk meredakan iritasi akibat UVB, stabilitas senyawa bioaktif yang optimal, serta kemudahan penggunaan tanpa residu lengket, menjadikannya lebih efektif dan nyaman untuk aplikasi dermatologi.¹⁵

Efektivitas ekstrak bunga *Catharanthus roseus* dalam formulasi pencerah kulit telah diperlihatkan dalam sejumlah penelitian. Uji *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak ini dapat mengurangi aktivitas tirosinase secara signifikan dan menurunkan produksi melanin pada model melanosit. Selain itu, penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak dalam produk perawatan kulit dapat menyebabkan pencerahan kulit yang lebih merata dan

mengurangi tampilan bintik-bintik hiperpigmentasi.²¹ Keamanan penggunaan ekstrak *Catharanthus roseus* juga telah diuji, dengan studi menunjukkan bahwa ekstrak ini umumnya aman untuk digunakan pada kulit, dengan efek samping minimal yang tidak signifikan pada konsentrasi yang digunakan dalam formulasi kosmetik.⁶⁷

Gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus*, kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin, bertindak sebagai antioksidan yang efektif mengurangi produksi ROS yang dihasilkan oleh paparan UVB. Dengan menurunkan ROS, gel ini dapat menghambat jalur p38 MAPK dan CREB yang berfungsi meningkatkan ekspresi MITF, sehingga menurunkan produksi melanin dan mengurangi hiperpigmentasi pada kulit.^{7,68} Gel ini juga berperan penting dalam meningkatkan kadar, antioksidan endogen yang esensial dalam menjaga keseimbangan redoks seluler kulit. Paparan UVB dapat menurunkan kadar glutathione, yang memperburuk kerusakan kulit dan memperparah hiperpigmentasi. Senyawa bioaktif dalam bunga *Catharanthus roseus* dapat merangsang peningkatan kadar Gpx, memperbaiki stres oksidatif pada kulit. GPx juga menghambat aktivitas tirosinase, enzim kunci dalam sintesis melanin, yang sering kali meningkat pada kulit yang terpapar UVB. Dengan menurunkan aktivitas tirosinase, gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* mampu mengurangi produksi melanin dan memperbaiki warna kulit, serta mengurangi pembentukan noda atau bercak gelap akibat hiperpigmentasi.^{7,69}

Gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* memberikan manfaat dengan menurunkan produksi melanin dan melindungi kulit dari kerusakan oksidatif.

Gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* juga mencegah terjadinya perubahan warna kulit lebih lanjut, memberikan solusi alami untuk kulit yang lebih cerah dan merata.⁴



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Paparan sinar UV-B berlebih menyebabkan terjadinya *photoaging* dan *photocarcinogenesis*.⁷⁰ Pada kondisi *photoaging*, salah satu perubahan mikroskopis yang dapat ditemukan pada lapisan dermis adalah peningkatan jumlah melanin. Akumulasi pigmen ini menjadi salah satu tanda khas yang muncul akibat paparan sinar ultraviolet dalam jangka panjang.⁷¹ Inflamasi yang dimediasi melalui ROS yang memengaruhi melanosit di epidermis.⁷² Mensekresikan α -MSH yang mengatur ekspresi MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*), Proses ini kemudian mendorong aktivasi enzim-enzim penting seperti tirosinase, Tyrp1, dan Tyrp2. Di sisi lain, paparan radiasi UV-B memicu peningkatan pembentukan ROS, yang menyebabkan kadar ROS dalam sel keratinosit maupun melanosit semakin tinggi. Akumulasi ROS tersebut dapat menimbulkan kerusakan DNA dan pada akhirnya mengaktifkan jalur melanogenesis, salah satunya melalui mekanisme yang melibatkan NF- κ B.⁷³ TGF- β memediasi penurunan regulasi aktivitas promotor MITF, mengurangi produksi tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 dan kadar protein MITF. TGF- β 1 menghambat faktor transkripsi dan pengatur utama MITF dalam melanosit, memengaruhi jalur ERK dan menurunkan regulasi MITF serta produksi enzim melanogenik.⁷⁴

Ekstrak bunga *Catharanthus roseus*, kaya akan antioksidan seperti flavonoid dan alkaloid, bekerja sinergis dengan glutathione (GSH) untuk

menetralkan ROS dan mengurangi stres oksidatif, menghentikan pemicu awal melanogenesis. Selain itu, ekstrak ini menekan aktivasi jalur sinyal p38 MAPK dan CREB, yang berperan dalam ekspresi MITF.¹¹

Bunga *Catharanthus roseus* mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti alkaloid, flavonoid, dan fenolik, yang berperan sebagai inhibitor kompetitif tirosinase. Senyawa ini bekerja dengan berikatan pada situs aktif enzim tirosinase, mencegah substrat L-tirosin untuk mengalami konversi menjadi L-DOPA, yang merupakan tahap awal dalam sintesis melanin, dengan menghambat proses ini, sehingga produksi melanin berkurang.

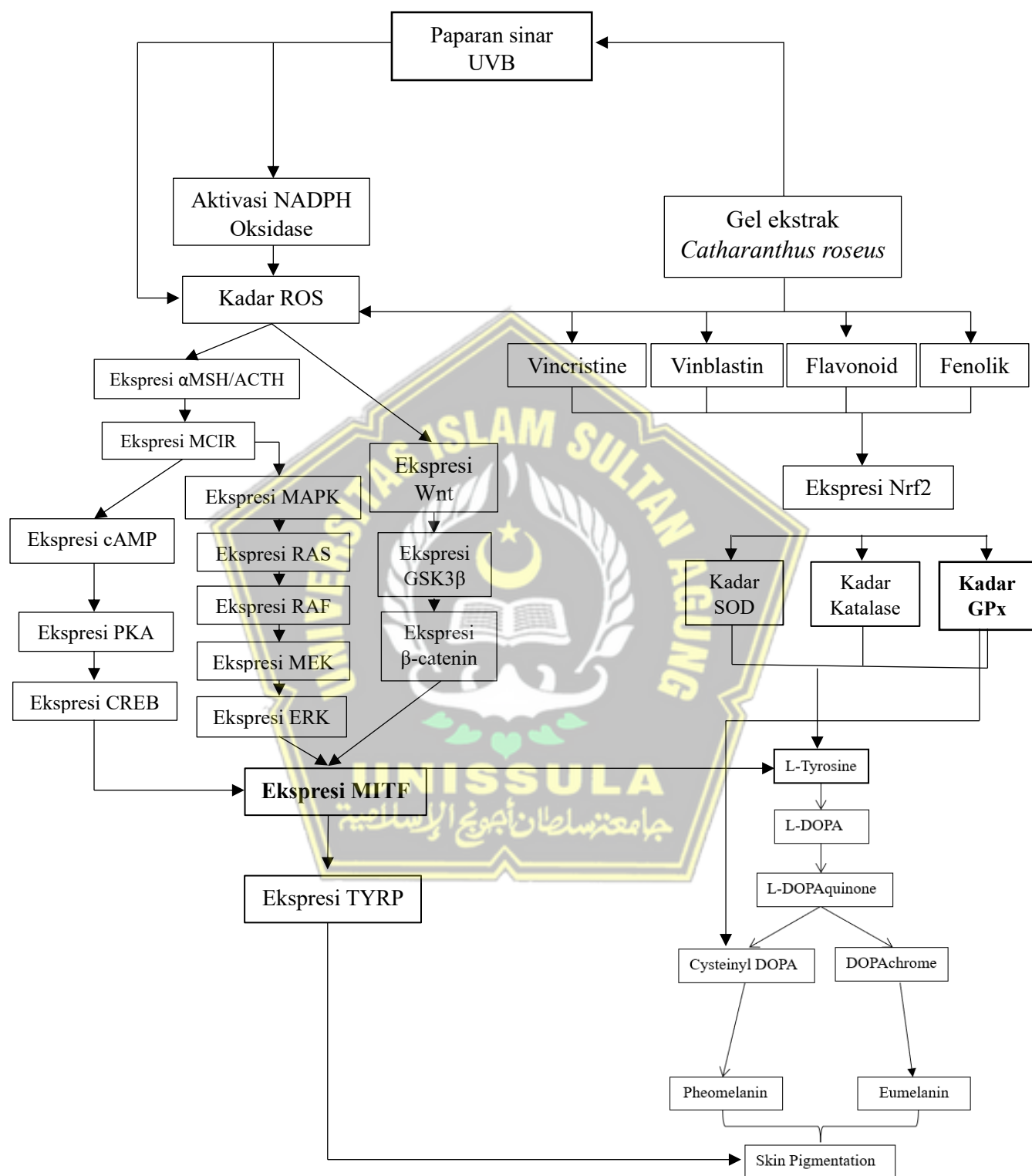
Senyawa bioaktif dalam ekstrak juga meningkatkan kadar GPx, yang tidak hanya menghambat tirosinase tetapi juga mengalihkan produksi melanin dari eumelanin (pigmen gelap) ke pheomelanin (pigmen terang). Dengan sifat antiinflamasi, alkaloid dalam bunga *Catharanthus roseus* menghambat jalur NF- κ B, menekan peradangan yang memicu melanogenesis. GPx mendukung perbaikan DNA dan menekan jalur p53, mengurangi sinyal melanogenesis akibat kerusakan DNA. Kandungan flavonoid (terutama kaempferol dan quercetin) dan asam fenolat dalam *Catharanthus roseus* adalah komponen utama yang secara langsung menekan hiperpigmentasi melalui inhibisi tirosinase, penurunan ROS, dan modulasi ekspresi gen pigmentasi.^{11,75}

Aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari bunga *Catharanthus roseus* dapat memberikan perlindungan tambahan terhadap sel kulit dari kerusakan lingkungan, seperti paparan sinar UV dan polusi, yang sering kali memperburuk hiperpigmentasi. Berperan dalam penghambatan produksi melanin tetapi juga

dalam melindungi kulit dari faktor eksternal yang dapat merangsang melanogenesis.^{6,76}

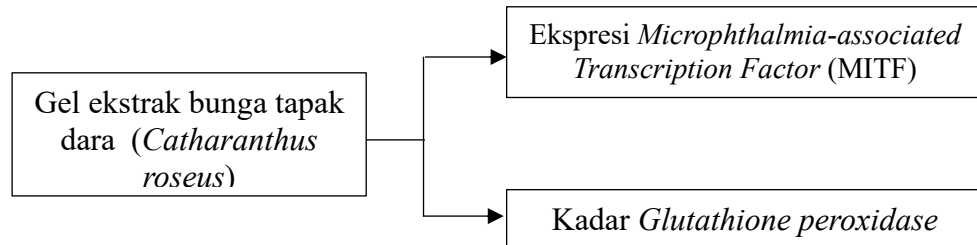
Kerangka teori ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga *Catharanthus roseus* memiliki mekanisme aksi yang komprehensif dalam mengurangi pigmentasi kulit melalui penghambatan jalur sinyal melanogenesis, penurunan ekspresi MITF, menjadikan ekstrak bunga *Catharanthus roseus* sebagai kandidat yang sangat potensial untuk digunakan dalam produk pencerah kulit, menawarkan alternatif alami yang mungkin lebih aman dan efektif dibandingkan dengan bahan kimia sintetis yang saat ini banyak digunakan dalam industri kosmetik.⁷⁷





Gambar 3.1 Alur Kerangka teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Alur kerangka konsep

3.3 Hipotesis

Ada pengaruh pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) dan kadar *Glutathione peroxidase* (GPx) pada jaringan kulit mencit yang di papar sinar UVB subkronis.

BAB IV

METODE PENELITIAN

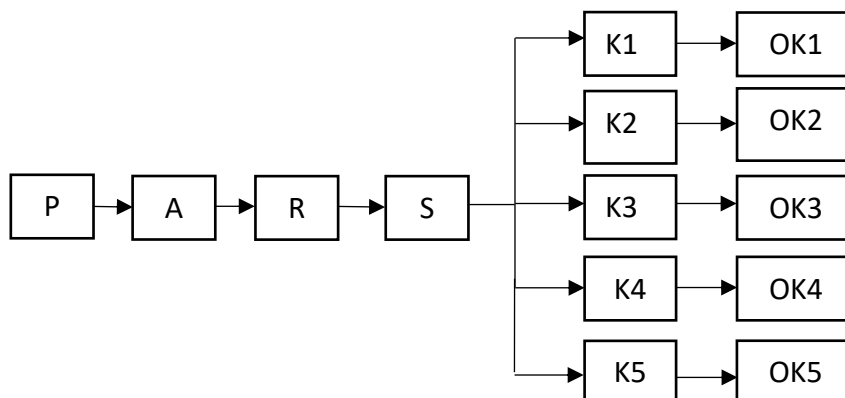
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan desain post-test only control group. Subjek penelitian adalah mencit jantan strain C57BL/6 dengan berat tubuh berkisar antara 20–25 gram. Adapun kelompok perlakuan disusun sebagai berikut:

- a. K1 (Kelompok Normal): Mencit tanpa paparan sinar UVB yang diberikan pakan standar,
- b. K2 (Kelompok kontrol negatif): Mencit dipaparan sinar UVB dan diberikan basis gel selama 14 hari,
- c. K3 (Kelompok kontrol positif): Mencit dipaparan sinar UVB dan diberikan vitamin E selama 14 hari,
- d. K4 (Perlakuan 1): Mencit dipaparan sinar UVB dan gel ekstrak *Catharanthus roseus* (ECR) dosis 15% selama 14 hari
- e. K5 (Perlakuan 2): Mencit dipaparan sinar UVB dan diberikan gel ekstrak *Catharanthus roseus* (ECR) dosis 30% selama 14 hari,

4.1.2 Rancangan Penelitian



Keterangan:

P	= Populasi
A	= Adaptasi
R	= Randomisasi
S	= Sampel
K1	= Kelompok Normal
K2	= Kelompok kontrol negatif (basis gel),
K3	= Kelompok kontrol positif diberikan vitamin E,
K4	= Perlakuan 1 diberikan gel ekstrak ECR dosis 15%
K5	= Perlakuan 2 diberikan gel ekstrak ECR dosis 30%
O	= Observasi/Pengamatan

4.1.3 Populasi dan Sampel Penelitian**4.1.3.1 Subjek Penelitian**

Subjek penelitian yang digunakan merupakan mencit strain C57BL/6 berusia 6–8 minggu dengan bobot tubuh antara 20–25 gram, yang telah dinyatakan sehat dan memenuhi kriteria kelayakan sebagai hewan uji. Sebelum perlakuan dimulai, seluruh mencit menjalani masa adaptasi selama tujuh hari di Laboratorium Hewan Coba, Integrated Biomedical Laboratory (IBL), Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.1.3.2 Sampel Penelitian**1. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

- a. Mencit umur 6-8 minggu
- b. Kondisi sehat
- c. Berat badan 20-25 g

2. Kriteria Drop Out

Mencit mati atau infeksi selama perlakuan

4.2 Besar Sampel

Total sampel dalam penelitian ini dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan. Jumlah hewan uji yang digunakan adalah 25 ekor, yang penentuannya mengacu pada perhitungan menggunakan rumus Federer untuk memastikan kecukupan sampel pada penelitian eksperimental.

Rumus Federer : $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

Keterangan : n = Jumlah sampel

: t = Jumlah kelompok

Banyak Kelompok : 5 kelompok (t =)

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

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

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

$$4 \times \geq 15$$

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

$$n \geq 4,75$$

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer, jumlah hewan uji yang dibutuhkan adalah sekitar 4,75 ekor untuk setiap kelompok. Oleh karena itu, peneliti menetapkan jumlah minimal lima ekor mencit per kelompok. Penelitian ini melibatkan lima kelompok perlakuan, masing-masing berisi lima ekor mencit. Untuk mengantisipasi kemungkinan terjadinya drop out, setiap kelompok ditambahkan satu ekor mencit cadangan, sehingga total hewan uji yang disiapkan dalam penelitian ini berjumlah 30 ekor..

4.3 Teknik Sampling Penelitian

Proses pemilihan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik probability sampling, di mana setiap hewan dalam populasi memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai sampel. Metode yang diterapkan adalah simple random sampling, yaitu pengambilan sampel secara acak tanpa perlakuan khusus. Seluruh mencit yang memenuhi kriteria, berjumlah 30 ekor, kemudian dibagi secara acak ke dalam lima kelompok perlakuan. Dari pembagian tersebut, satu kelompok ditetapkan sebagai kelompok kontrol, sedangkan empat kelompok lainnya berfungsi sebagai kelompok perlakuan..

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* (ECR) dosis 15% dan 30%

2. Variabel Prakondisi

Mencit yang dipapar sinar UV-B subkronis selama 14 hari

3. Variabel Terikat

Ekspresi MITF dan kadar GPx

4.5 Definisi Operasional

a. Gel Ekstrak bunga *Catharanthus roseus* (ECR)

Gel Ekstrak bunga *Catharanthus roseus* dibuat dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, ekstrak yang diperoleh dibuat sediaan gel dosis 15% dan 30%.¹⁵ Dengan pembuatan basis gel dari *propilen glikol*, PVA

(*Poliviny Alcohol*), HPMC (*Hidroksipropil metilselulosa*) *gelling agent* yang merupakan bahan pembentuk gel, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, etanol 96%, aquades, diberikan secara topikal 1x setiap hari pada bagian punggung sebanyak 0,5g selama 14 hari paparan UVB subkronik. Satuan ukur mg dengan skala Ordinal

b. Ekspresi MITF

Ekspresi MITF adalah tingkat pewarnaan positif protein Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) pada sel melanosit jaringan kulit mencit setelah perlakuan topikal selama 14 hari dan setelah terpapar sinar UVB subkronik. Pemeriksaan dilakukan menggunakan metode Imunohistokimia (IHC) dengan antibodi spesifik MITF. Sel dinyatakan positif apabila inti sel menunjukkan pewarnaan coklat (*nuclear staining*) yang merupakan hasil reaksi kromogen DAB terhadap keberadaan protein MITF. Penilaian dilakukan pada 5 lapang pandang representatif pada perbesaran 400x, dengan menghitung jumlah seluruh melanosit dan jumlah sel yang memperlihatkan pewarnaan positif MITF. Ekspresi MITF dinyatakan sebagai persentase sel positif.

Hasil diukur dalam persentase (%) dan skala ukur rasio.

c. Kadar GPx

Kadar GPx serum merupakan nilai konsentrasi enzim Glutathione Peroxidase yang terukur pada serum darah mencit setelah perlakuan topikal selama 14 hari dan paparan UVB kronik. Variabel ini dikuantifikasi

menggunakan metode ELISA sesuai karakteristik kit komersial, dengan hasil dinyatakan dalam satuan ng/L dan skala ukur rasio. Nilai GPx digunakan sebagai indikator operasional untuk merepresentasikan kapasitas antioksidan sistemik mencit dalam menanggapi stres oksidatif akibat perlakuan yang diberikan, hasil dengan satuan ng/L dan skala ukur rasio.

4.6 Bahan atau Materi Penelitian

1. Dalam proses pembuatan ekstrak, bahan yang diperlukan adalah bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) serta etanol 70% sebagai pelarut
2. Selama tahap perlakuan, bahan yang digunakan meliputi mencit sebagai hewan uji, beserta pakan dan air minum untuk menunjang kebutuhan dasar hewan tersebut.
3. Untuk pemeriksaan ELISA, berbagai bahan laboratorium diperlukan, di antaranya microplate ELISA, standard diluent, blocking buffer, sample diluent, biotinylated antibody, capture antibody, ABC, HRP, TMB, stop solution, dan wash solution

4.7 Peralatan

4.7.1 Alat

1. Dalam proses pembuatan ekstrak, sejumlah alat diperlukan, antara lain rotary evaporator, alat Soxhlet, oven, kertas saring, mesin penggiling, gelas ukur, pipet ukur, serta wadah penyimpanan yang steril.
2. Pada tahap perlakuan terhadap mencit, berbagai peralatan digunakan seperti kandang lengkap beserta tempat makan dan minum, papan fiksasi, jarum, sarung tangan, masker, pinset, gunting, pisau cukur, serta alat UV

light tipe broadband dengan puncak emisi 302 nm dan dosis minimal eritem 0,5 J/cm², termasuk juga wadah untuk proses paparan.

3. Untuk persiapan sampel pemeriksaan, alat yang dibutuhkan meliputi pisau scalpel, larutan PBS dengan pH 7,4, serta sentrifus.
4. ada tahap pemeriksaan ELISA, digunakan kit ELISA, microplate polystyrene 96-well, mikropipet, ELISA reader, plate ELISA, serta inkubator..

4.8 Cara Penelitian dan Alur kerja

4.8.1 Perolehan Ethical Clearance

Permohonan ethical clearance untuk penelitian ini diajukan kepada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang guna mendapatkan persetujuan pelaksanaan penelitian, sebelum penelitian dilakukan.

4.8.2 Pembuatan Ekstrak *Catharanthus roseus*

Sampel bunga *Catharanthus roseus* yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 1 kilogram, dengan bagian tanaman yang diambil khusus pada bagian bunga. Setelah dipisahkan dari bagian lain yang tidak digunakan, bunga kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C. Proses pengeringan ini dievaluasi melalui pemeriksaan kadar air menggunakan moisture balance. Apabila kadar air yang diperoleh berada di bawah 10%, maka hasil pengeringan dinilai memenuhi syarat.

Bunga yang telah kering selanjutnya melalui proses sortasi, dipotong menjadi ukuran kecil, kemudian ditimbang sebelum dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk tersebut kemudian diayak menggunakan ayakan berukuran 20 mesh untuk mendapatkan ukuran partikel yang lebih seragam.

Sebanyak 500 gram serbuk simplisia bunga *Catharanthus roseus* kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap untuk menghindari paparan cahaya yang dapat merusak senyawa aktif. Proses maserasi dilakukan dengan perendaman selama lima hari, dan selama masa perendaman, botol dikocok beberapa kali dalam sehari, yakni sekitar tiga kali.

Setelah tiga hari pertama, campuran disaring, lalu ampas simplisia dimaserasi kembali selama dua hari dengan penambahan pelarut etanol 70% sebanyak 1.250 ml. Proses maserasi ini diulang sebanyak tiga kali untuk memastikan senyawa aktif terekstraksi secara optimal. Semua filtrat dari tahapan maserasi kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

4.8.3 Pembuatan Sediaan Gel Ekstrak *Catharanthus roseus*

Proses pembuatan gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* diawali dengan menimbang seluruh bahan yang diperlukan sesuai formulasi. Bahan PVA dilelehkan terlebih dahulu menggunakan waterbath hingga benar-

benar mencair secara merata. Setelah itu, HPMC dikembangkan dengan menambahkan aquadest dingin sambil diaduk secara terus-menerus sampai terbentuk massa yang mengembang dengan sempurna.

Pada tahap berikutnya, metilparaben dan propilparaben dilarutkan terlebih dahulu ke dalam propilen glikol hingga tercampur dengan baik. Semua fase yang telah dipersiapkan ini kemudian dicampurkan secara bertahap dan dihomogenkan hingga membentuk basis gel yang seragam.

Ekstrak bunga *Catharanthus roseus*, yang sebelumnya telah dilarutkan dengan sedikit aquadest, ditambahkan ke dalam campuran dasar gel secara perlahan sambil terus diaduk agar tercapai homogenitas yang optimal. Proses ini dilakukan hingga seluruh ekstrak tercampur secara merata dan diperoleh sediaan gel dengan konsistensi yang stabil dan seragam.¹⁶

4.8.4 Persiapan Hewan Uji

Dalam penelitian ini digunakan hewan uji berupa mencit berumur 6–8 minggu dengan berat badan antara 20–25 gram. Seluruh mencit ditempatkan di ruangan dengan suhu terkontrol, yaitu sekitar 28–32°C, serta dilengkapi ventilasi yang memadai agar kondisi lingkungan tetap stabil. Sebelum perlakuan dimulai, hewan uji menjalani masa adaptasi selama satu minggu. Selama periode adaptasi tersebut, mencit diberikan pakan berupa pelet dan air minum putih secara *ad libitum* sehingga kebutuhan nutrisi dan hidrasi tetap terpenuhi.

Jumlah sampel yang digunakan adalah 30 ekor mencit, yang dipilih secara acak dan kemudian dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Pembagian ini dilakukan dengan menempatkan masing-masing kelompok pada kandang terpisah. Kelima kelompok tersebut terdiri dari: kelompok kontrol sehat, kelompok kontrol negatif yang diberi basis gel saja, kelompok kontrol positif yang mendapatkan vitamin E, serta dua kelompok perlakuan yang masing-masing menerima gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* dengan konsentrasi 15% dan 30%. Setiap kandang ditempati oleh lima ekor mencit ditambah satu ekor cadangan untuk mengantisipasi kemungkinan drop out selama penelitian berlangsung.

4.8.5 Paparan UVB kronik

1. Mencit yang sudah diadaptasi selama 7 hari.
2. Bulu pada bagian punggung mencit di cukur dengan ukuran diameter 3 cm hingga bersih.
3. Pada punggung mencit di beri paparan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) yang berjarak 20 cm dengan dosis minimal eritem 0,5 J/cm² selama 10 menit setiap hari selama 14 hari.
4. Kelompok mencit perlakuan K3, K4 dan K5 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan vitamin E, gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* 15% dan 30% yang diberikan satu kali sehari 1 jam setelah penyinaran UV B.

4.8.6 Pengambilan Sampel Jaringan Kulit Mencit

Pengambilan jaringan kulit mencit dilakukan pada hari ke-15 setelah seluruh perlakuan selesai diberikan. Sebelum jaringan diambil, mencit dieutanasia secara humane melalui prosedur pembiusan hingga tidak sadar dan tidak memberikan respons, kemudian dilakukan terminasi sesuai standar etika hewan coba.

Prosedur pengambilan sampel jaringan dilakukan dengan membuat sayatan pada area kulit mencit yang telah mendapatkan paparan UVB. Sayatan dibuat menggunakan gunting dan pinset hingga diperoleh potongan jaringan yang diperlukan. Jaringan yang telah diambil kemudian ditempatkan dalam larutan PBS dengan pH 7,4.

Selanjutnya, sampel jaringan tersebut dihomogenisasi dalam kondisi dingin, yakni pada suhu sekitar 4°C, untuk menjaga stabilitas komponen yang akan dianalisis. Setelah proses homogenisasi selesai, campuran kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000–3000 rpm selama 20 menit.

Hasil sentrifugasi akan menghasilkan supernatan, yaitu bagian cairan dengan bobot jenis lebih rendah yang berada di lapisan atas. Supernatan inilah yang kemudian diambil dan digunakan sebagai sampel uji. Apabila sampel tidak langsung dianalisis, supernatan dapat disimpan terlebih dahulu pada suhu –20°C untuk menjaga kualitasnya.

4.8.7 Presedur pemeriksaan ekspresi MITF menggunakan Metode IHC

1. Bagian parafin (ketebalan 5 μm) dipanaskan hingga 60°C dan dideparafinasi dengan cara direndam dalam tiga pertukaran xilena (masing-masing 30 menit).
2. Bagian-bagian tersebut kemudian direhidrasi melalui serangkaian alkohol bertingkat pencucian (etanol 100%, etanol 100%, 95%, 70%, 50%, dan 30%, deionisasi air, dan air deionisasi lagi; 20 menit untuk setiap pertukaran).
3. Bagian jaringan yang dideparafinasi dicerna dengan hialuronidase (1 mg/mL dalam 0,1 M natrium asetat dan 150 mM natrium klorida, pH 5,5) selama 30 menit pada suhu 37°C untuk mengekspos epitop antigenik.
4. Setelah mencuci bagian tiga kali selama 10 menit masing-masing dalam buffer fosfatsaline (PBS), bagian diinkubasi selama 30 menit dalam metanol yang mengandung 0,3% hidrogen peroksida untuk memadamkan aktivitas peroksidase endogen.
5. Cuci bagian tersebut tiga kali masing-masing 10 menit dalam PBS, kemudian inkubasi dengan 1,5%
6. Setelah dicuci kembali, potongan selanjutnya diinkubasi dengan poliklonal primer antibodi A 1/30 (10 $\mu\text{g/mL}$) selama 4 jam pada suhu kamar.

7. Bagian tersebut dibilas, selanjutnya diinkubasi dengan antibodi terbiotinilasi ($2 \mu\text{g/mL}$, *Dako Corporation; Carpinteria, CA*) selama 30 menit pada suhu kamar.
8. Selanjutnya, bagian tersebut dicuci tiga kali dan diolah dengan konjugasi *peroksidase streptavidin* ($2 \mu\text{g/mL}$, *Dako*) selama 30 menit pada suhu kamar.
9. Setelah tiga kali pencucian selama 10 menit dalam PBS, antibodi yang terikat ditunjukkan dengan menggunakan Substrat 3-amino-9-etilkarbazol (substrat AEC, *Dako*) dengan adanya 3% hidrogen peroksida selama 15 menit.
10. Setelah pengembangan substrat, bagian-bagian tersebut dibilas dan diwarnai Kembali
11. direndam selama 1 menit dalam pewarnaan hematoksin Smith (*Sigma*).
12. Sampel diberi kode, diperiksa ekspertis patologi anatomi dan diberi skor secara semikuantitatif.⁷⁸

4.8.8 Prosedur Pemeriksaan kadar GPx menggunakan metode ELISA

Pemeriksaan kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) dilakukan menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan reagen komersial BT LAB sesuai dengan petunjuk kerja kit. Sampel yang digunakan berupa serum darah mencit, yang diperoleh melalui pengambilan darah pada sinus orbitalis setelah seluruh perlakuan selesai. Darah yang terkumpul disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm

selama 10 menit untuk memisahkan serum, kemudian serum jernih disimpan pada suhu -20°C hingga waktu analisis, dengan prosedur analisis sebagai berikut:

1. Sebanyak 100 μL serum sampel atau larutan standar dimasukkan ke dalam sumur mikrotiter yang telah dilapisi antibodi spesifik terhadap GPx.
2. Sampel diinkubasi sesuai waktu yang tertera dalam protokol kit, kemudian dicuci untuk menghilangkan sisa yang tidak terikat.
3. Ditambahkan konjugat enzim (*HRP-labeled antibody*) ke setiap sumur.
4. Setelah itu, dilakukan inkubasi kembali dan proses pencucian sesuai prosedur kit.
5. Ditambahkan substrat TMB (*Tetramethylbenzidine*) untuk menghasilkan perubahan warna yang proporsional dengan kadar GPx dalam sampel.
6. Reaksi dihentikan menggunakan larutan stop solution.
7. Absorbansi dibaca menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450 nm.
8. Kadar GPx dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat dari larutan standar dengan konsentrasi yang telah diketahui.

4.9 Metode Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini terlebih dahulu ditabulasi sebelum dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS. Untuk

memastikan pemilihan metode analisis yang tepat, dilakukan uji normalitas dengan Shapiro–Wilk dan uji homogenitas varians melalui Levene test.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa parameter kadar GPx memiliki distribusi data yang normal serta varians yang homogen. Oleh karena itu, analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji parametrik One Way ANOVA, yang kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD guna mengetahui kelompok-kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan.

Sebaliknya, parameter ekspresi MITF menunjukkan distribusi data yang tidak normal meskipun varians antar kelompok tetap homogen. Dengan demikian, analisis menggunakan pendekatan nonparametrik dianggap lebih sesuai, yaitu dengan menerapkan uji Kruskal–Wallis untuk menilai adanya perbedaan antar kelompok perlakuan. Apabila uji tersebut menunjukkan perbedaan, analisis dilanjutkan dengan uji Mann–Whitney untuk mengidentifikasi pasangan kelompok yang memiliki perbedaan paling bermakna.

Pengambilan keputusan terhadap hipotesis dilakukan berdasarkan tingkat signifikansi $\alpha = 0,05$, di mana nilai $p < 0,05$ dianggap menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0,05$).

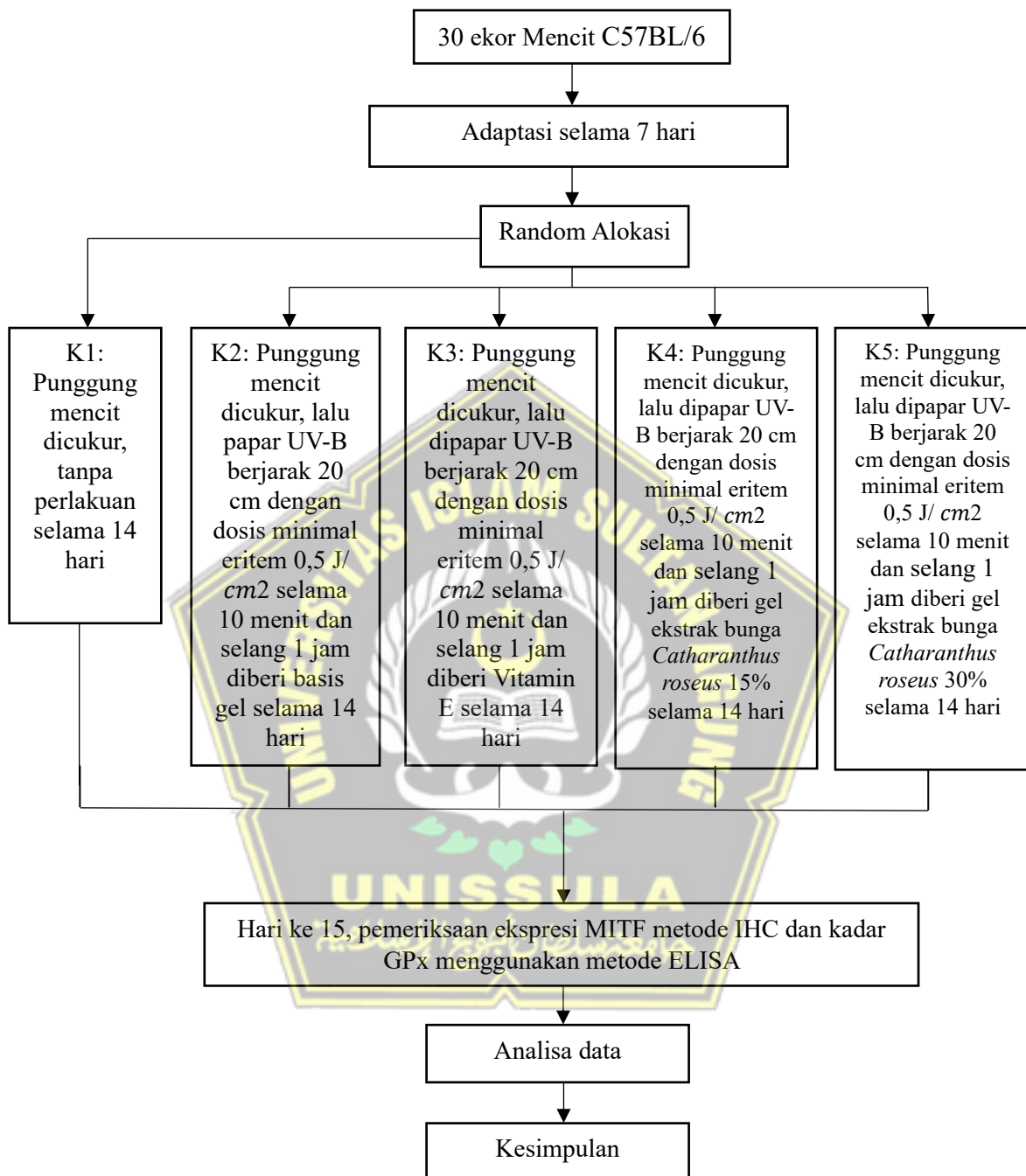
4.10 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium STIFAR Semarang untuk ekstraksi bunga *Catharanthus roseus*, kemudian di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk perlakuan hewan

coba dan analisis kadar GPx dengan metode ELISA dan ekspresi MITF metode
IHK yang dilakukan pada bulan Agustus - November 2025.



4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap ekspresi *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) dan kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) pada jaringan kulit mencit jantan C57BL/6 yang dipaparkan sinar ultraviolet B (UVB) subkronis. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Jumlah sampel 25 ekor mencit dijadikan sebagai sampel penelitian yang dibagi ke dalam lima kelompok, yaitu kelompok normal (K1) tanpa paparan UVB dan hanya diberikan pakan standar; kelompok kontrol negatif (K2) yang dipaparkan sinar UVB dan diberi basis gel; kelompok kontrol positif (K3) yang dipaparkan UVB dan diberi vitamin E; serta dua kelompok perlakuan, yaitu K4 yang diberi gel ekstrak *Catharanthus roseus* 15% dan K5 yang diberi gel ekstrak *Catharanthus roseus* 30% selama 14 hari.

Mencit diadaptasi selama tujuh hari sebelum perlakuan. Bulu punggung dicukur dengan diameter sekitar 3 cm. Paparan sinar UVB dilakukan menggunakan broadband lamp berpanjang gelombang 302 nm dengan jarak 20 cm dan dosis 0,5 J/cm² selama 10 menit setiap hari selama 14 hari. Perlakuan topikal diberikan satu jam setelah penyinaran UVB pada kelompok K3, K4, dan K5 sesuai dosis masing-masing. Hasil pengamatan terhadap ekspresi MITF serta kadar GPx pada jaringan kulit mencit dari setiap kelompok disajikan pada bagian berikutnya.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit yang terpapar sinar UVB subkronis

Berdasarkan Tabel 5.1 dan gambar 5.1, rata-rata ekspresi MITF pada kelompok normal (K1) menunjukkan nilai terendah sebesar $27.47 \pm 3.62\%$, yang mencerminkan kondisi kulit tanpa paparan sinar UVB. Kelompok kontrol negatif (K2) mengalami peningkatan ekspresi MITF menjadi $31.82 \pm 8.11\%$ akibat paparan UVB tanpa perlakuan protektif. Nilai tertinggi ditemukan pada kelompok kontrol positif (K3) sebesar $51.06 \pm 8.16\%$, menunjukkan aktivitas melanogenesis yang lebih tinggi. Kelompok perlakuan dengan gel ECR 15% (K4) memiliki rata-rata ekspresi MITF $34.49 \pm 7.91\%$, sedangkan kelompok gel ECR 30% (K5) menunjukkan nilai $40.49 \pm 3.74\%$. Ekspresi MITF lebih tinggi pada konsentrasi 30% dibandingkan 15%.

Tabel 5.1 Uji Deskriptif, Normalitas, Homogenitas, dan Uji Beda antar kelompok dengan *Kruskal Wallis Test* terhadap ekspresi MITF

Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD (%)	Ekspresi MITF		
		Normalitas (<i>Saphiro Wilk</i>)	Homogenitas (<i>Levene Test</i>)	<i>Kruskal Wallis</i>
K1(Kelompok Normal)	27.47 ± 3.62	0,011		
K2 (Kontrol Negatif)	31.82 ± 8.11	0,110*		
K3(Kontrol Positif)	51.06 ± 8.16	0,527*	0,294*	0,003*
K4(Gel ECR 15%)	34.49 ± 7.91	0,331*		
K5(Gel ECR 30%)	40.49 ± 3.74	0,728*		

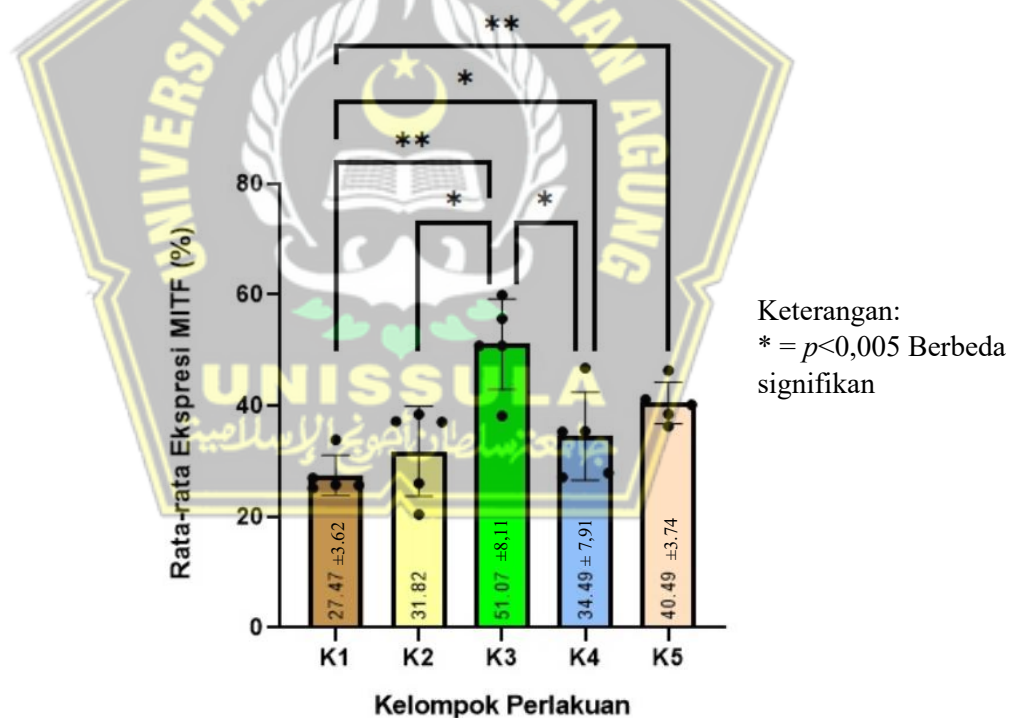
Keterangan: **Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

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

* *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$ = signifikan)

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa hasil uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test* memperlihatkan sebagian besar data ekspresi MITF

berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$, kecuali pada kelompok K1 (Kelompok Normal) yang memiliki nilai $p = 0,011$ sehingga tidak berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas menggunakan *Levene Test* menunjukkan nilai $p = 0,294$ ($p > 0,05$), yang menandakan bahwa data memiliki varians yang homogen. Berdasarkan temuan tersebut, analisis dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis Test*, karena terdapat satu kelompok data yang tidak berdistribusi normal. Nilai p pada uji *Kruskal-Wallis Test* sebesar 0,003 ($p < 0,05$) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada ekspresi MITF antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.1 Rata-rata Ekspresi MITF tiap kelompok

Ekspresi MITF lebih tinggi ditemukan pada kelompok K3 (51,07%), diikuti K5 (40,49%), K4 (34,49%), K2 (31,82%), dan K1 (27,47%). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin E maupun ekstrak *Catharanthus*

roseus meningkatkan ekspresi MITF secara bermakna dibandingkan kelompok yang hanya dipaparkan UVB.

Hasil uji *Kruskal–Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok pada ekspresi MITF ($p = 0,003$). Karena asumsi distribusi tidak terpenuhi untuk uji parametrik, dilanjutkan dengan uji post-hoc non-parametrik (uji *Mann–Whitney*) pada pasangan kelompok. Pengujian pasangan dilakukan dengan penyesuaian tingkat signifikansi menggunakan koreksi Bonferroni (α koreksi = $0,05 / \text{jumlah pasangan}$). Hasil uji pasangan dilaporkan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Perbandingan antar dua kelompok dengan uji *Mann–Whitney* pada Ekspresi MITF

Kelompok	K2 (Kontrol Negatif)	K3(Kontrol Positif)	K4(Gel ECR 15%)	K5(Gel ECR 30%)
K1(Kelompok Normal)	0,310	0,008*	0,032*	0,008*
K2 (Kontrol Negatif)	-	0,016*	1,000	0,056
K3(Kontrol Positif)	-	-	0,016*	0,095
K4(Gel ECR 15%)	-	-	-	0,151

Keterangan:

$p < 0,05$ = berbeda signifikan (*)

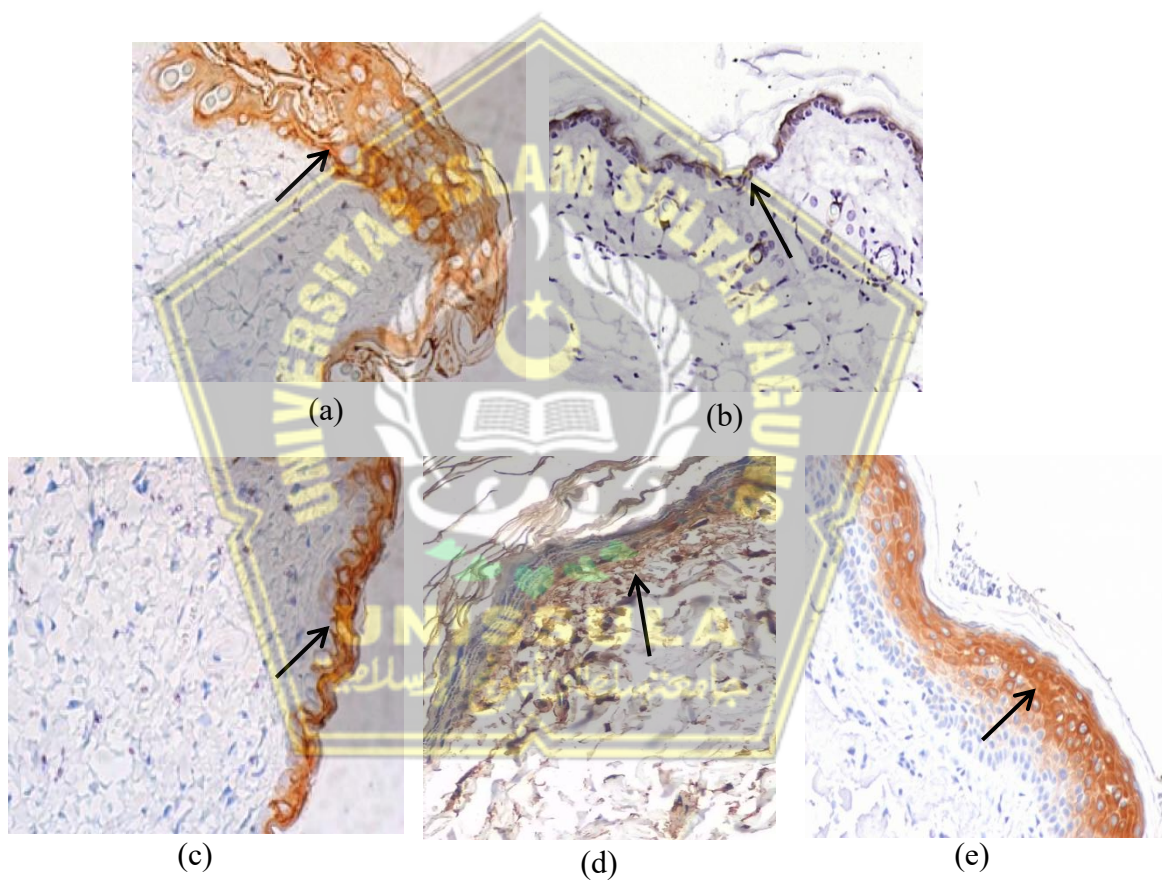
Hasil uji *Mann–Whitney* terhadap perbandingan ekspresi MITF antar kelompok perlakuan. Nilai signifikansi menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara beberapa kelompok. Kelompok kontrol positif (K3) memiliki ekspresi MITF yang berbeda signifikan dibandingkan kelompok normal (K1)

dengan nilai $p=0,008$ ($p<0,01$). Kelompok perlakuan gel ECR 15% (K4) juga menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok normal (K1) dengan nilai $p=0,032$ ($p<0,05$). Perbedaan signifikan juga ditemukan antara kelompok gel ECR 30% (K5) dan kelompok normal (K1) dengan nilai $p=0,008$ ($p<0,01$).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia (IHK) pada Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) menunjukkan perbedaan intensitas pewarnaan antar kelompok perlakuan. Pewarnaan dengan kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidine) menghasilkan warna coklat pada inti sel yang mengekspresikan MITF, yang tampak jelas sebagai melanosit aktif pada lapisan basal epidermis. Peneliti melakukan pengamatan pada lima lapang pandang representatif dengan perbesaran $400\times$ dan menganalisis setiap gambar menggunakan perangkat lunak ImageJ. Melalui fitur *Color Deconvolution (H-DAB)*, ImageJ memisahkan sinyal DAB dari pewarna hematoksilin, kemudian menetapkan *threshold* untuk menandai inti sel positif MITF. Selanjutnya perangkat lunak menghitung jumlah inti sel berwarna coklat dan membandingkannya dengan total melanosit sehingga diperoleh nilai persentase ekspresi MITF dengan skala ukur rasio secara objektif dan terukur.

Secara mikroskopis, variasi intensitas pewarnaan mencerminkan perbedaan aktivitas melanosit yang dipengaruhi oleh paparan UVB maupun perlakuan topikal (vitamin E dan gel ekstrak *Catharanthus roseus*). Pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak yang lebih besar tampak intensitas pewarnaan DAB yang lebih kuat, menunjukkan ekspresi MITF yang lebih tinggi serta aktivitas melanosit yang lebih aktif. Kondisi ini disertai

dengan susunan melanosit yang lebih padat pada lapisan basal dan kecenderungan peningkatan ketebalan epidermis, menggambarkan stimulasi melanogenesis akibat sinyal oksidatif residual. Sebaliknya, pada kelompok dengan perlakuan lebih rendah, pewarnaan tampak lebih lemah, aktivitas melanosit menurun, dan susunan epidermis terlihat lebih teratur tanpa penebalan (Gambar 5.1).



Gambar 5.2 Mikroskopis ekspresi MITF pada tiap kelompok perlakuan (kelompok kontrol normal (a), kelompok kontrol negatif (b), kelompok kontrol positif (c), kelompok perlakuan 1 gel ekstrak *Catharanthus roseus* dosis 15% (d), dan kelompok perlakuan 2 gel ekstrak *Catharanthus roseus* dosis 30% (e))

Ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit menunjukkan perbedaan antar kelompok perlakuan sebagaimana ditampilkan pada Gambar 5.1. Pada

kelompok kontrol normal (a), pewarnaan cokelat tampak merata pada lapisan basal epidermis, menunjukkan keberadaan sel melanosit yang mengekspresikan MITF dalam kondisi tanpa paparan sinar UVB. Melanosit terlihat tersusun mengikuti pola lapisan basal dengan inti sel yang terwarnai sesuai karakteristik pewarnaan imunohistokimia MITF.

Pada kelompok kontrol negatif (b) yang menerima paparan sinar UVB dan hanya diberikan basis gel, intensitas pewarnaan cokelat pada lapisan basal tampak lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol normal. Penurunan pewarnaan tersebut menggambarkan berkurangnya jumlah sel yang menunjukkan ekspresi MITF pada epidermis setelah paparan UVB, yang sesuai dengan respons stres oksidatif dan perubahan ekspresi protein akibat iradiasi UVB.

Pada kelompok kontrol positif (c) yang dipaparkan sinar UVB dan diberikan vitamin E, intensitas pewarnaan cokelat pada lapisan basal epidermis terlihat lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Peningkatan intensitas pewarnaan tersebut menunjukkan lebih banyak sel melanosit yang terdeteksi mengekspresikan MITF. Kelompok perlakuan 1 (d) yang diberikan gel ekstrak *Catharanthus roseus* (ECR) dosis 15% memperlihatkan pewarnaan cokelat dengan intensitas sedang pada lapisan basal epidermis. Jumlah sel positif MITF pada kelompok ini tampak lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif, dengan intensitas yang masih lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif.

Kelompok perlakuan 2 (e) yang diberikan gel ECR dosis 30% memperlihatkan intensitas pewarnaan coklat paling kuat pada lapisan basal epidermis. Pewarnaan terlihat lebih merata dibandingkan kelompok perlakuan lainnya dan mendekati pola pewarnaan pada kelompok kontrol normal. Pola ini menunjukkan jumlah sel positif MITF yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan 2 berdasarkan hasil pewarnaan imunohistokimia.

5.1.2 Kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) pada serum darah mencit yang terpapar sinar UVB subkronis

Hasil rata-rata analisis kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) pada serum darah mencit menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) menunjukkan adanya perbedaan kadar GPx antar kelompok perlakuan (Tabel 5.1 dan Gambar 5.2). Rata-rata kadar GPx tertinggi terdapat pada kelompok normal (K1) yaitu sebesar $10,66 \pm 0,85$ ng/mL, sedangkan kadar terendah ditemukan pada kelompok kontrol negatif (K2) sebesar $2,60 \pm 1,22$ ng/mL. Kadar GPx lebih tinggi terjadi pada kelompok kontrol positif (K3) yang diberikan vitamin E ($3,70 \pm 1,00$ ng/mL), serta pada kelompok perlakuan gel ekstrak *Catharanthus roseus* (ECR) 15% (K4) dan 30% (K5) dengan nilai masing-masing $8,29 \pm 1,95$ ng/mL dan $9,15 \pm 0,91$ ng/mL.

Tabel 5.3 Uji Deskriptif, Normalitas, Homogenitas, dan Uji Beda antar kelompok dengan *One way Anova* terhadap kadar GPx

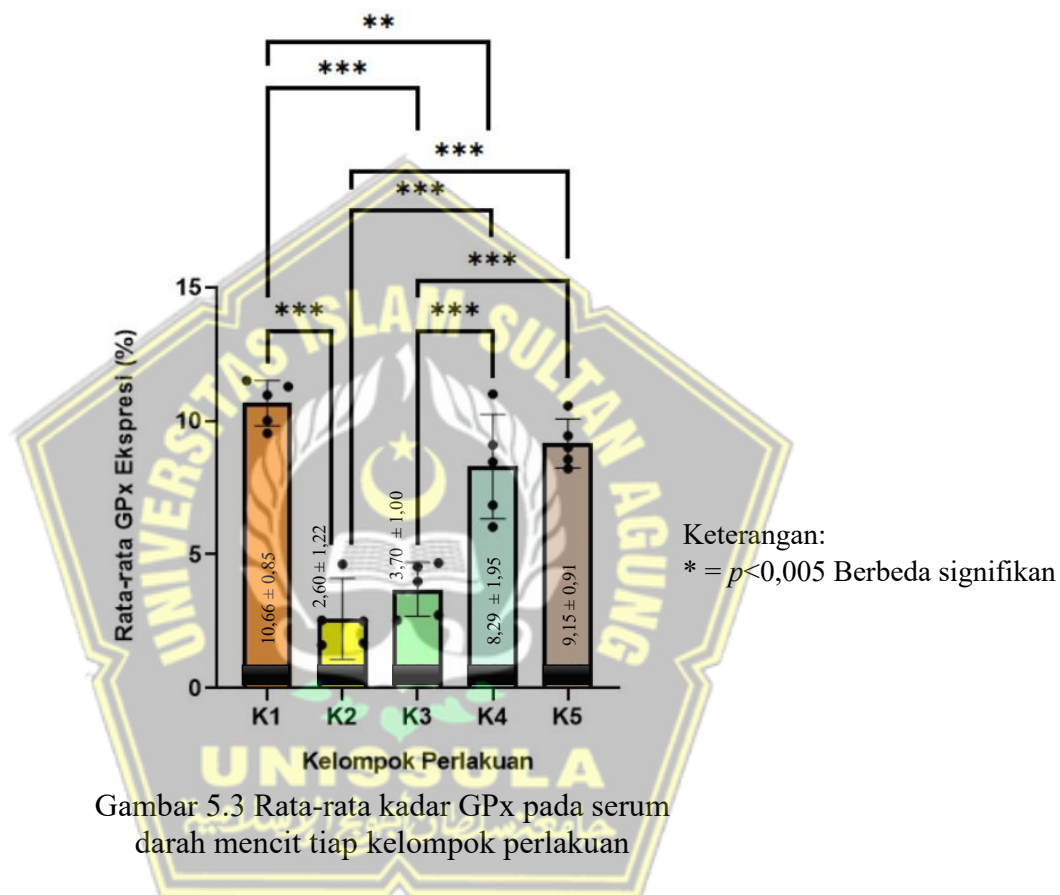
Kelompok Perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD (ng/mL)	Kadar GPx			Hasil uji beda dengan <i>Oneway Anova</i>
		Normalitas (<i>Saphiro Wilk</i>)	Homogenitas (<i>Levene Test</i>)		
K1 (Kelompok Normal)	$10,66 \pm 0,85$	0,442*			0,001*
K2 (Kontrol Negatif)	$2,60 \pm 1,22$	0,121*	0,329*		

K3(Kontrol Positif)	3,70 ± 1,00	0,230*
K4 (Gel ECR 15%)	8,29 ± 1,95	0,892*
K5 (Gel ECR 30%)	9,15 ± 0,91	0,715*

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

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

* *Oneway Anova* ($p < 0,05$ = signifikan)



Gambar 5.3 Rata-rata kadar GPx pada serum darah mencit tiap kelompok perlakuan

Hasil uji normalitas menggunakan Shapiro–Wilk menunjukkan bahwa seluruh data memiliki distribusi yang normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas varians dengan Levene test juga memberikan nilai $p = 0,329$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data bersifat homogen. Berdasarkan kondisi tersebut, analisis dilanjutkan menggunakan One Way ANOVA, yang kemudian menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan terhadap kadar GPx ($p = 0,001$).

Temuan ini mengindikasikan bahwa pemberian gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus*, khususnya pada konsentrasi 30%, mampu meningkatkan kadar GPx pada serum darah mencit yang terpapar sinar UVB secara subkronis. Peningkatan tersebut bahkan mendekati nilai yang ditemukan pada kelompok normal, sehingga menunjukkan efek protektif yang cukup kuat dari ekstrak tersebut.

Tabel 5.4 menyajikan hasil uji *Post Hoc LSD* yang dilakukan sebagai lanjutan dari uji *One Way Anova* untuk mengidentifikasi perbedaan kadar GPx antar pasangan kelompok.

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc LSD* kadar GPx pada tiap kelompok

Kelompok			95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
K1 (Kelompok Normal)	K2 (Kontrol Negatif)	0,000*	6,407	9,718
	K3 (Kontrol Positif)	0,000*	5,304	8,616
	K4 (Gel ECR 15%)	0,007*	0,719	4,031
	K5 (Gel ECR 30%)	0,072	-0,147	3,164
K2 (Kontrol Negatif)	K3 (Kontrol Positif)	0,180	-2.758	0,553
	K4 (Gel ECR 15%)	0,000*	-7.343	-4,032
	K5 (Gel ECR 30%)	0,000*	-8.210	-4,898
Kontrol Positif)	K4 (Gel ECR 15%)	0,000*	-6.241	-2,929
	K5 (Gel ECR 30%)	0,000*	-7.107	-3,796
K4 (Gel ECR 15%)	K5 (Gel ECR 30%)	0,288	-2.522	0,789

Keterangan:

$p < 0,05$ = berbeda signifikan (*)

Tabel 5.2 menunjukkan hasil uji lanjut *Post Hoc LSD* terhadap kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) antar kelompok perlakuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok normal (K1) dengan seluruh kelompok yang dipapar sinar UVB, yaitu K2 (kontrol negatif), K3 (kontrol positif), K4 (gel ECR 15%), dan K5 (gel ECR 30%). Hal ini mengindikasikan bahwa paparan sinar UVB menurunkan kadar GPx jaringan kulit secara bermakna dibandingkan kondisi normal, meskipun pemberian perlakuan topikal menunjukkan peningkatan kadar enzim tersebut.

Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif (K2) dengan kelompok perlakuan K4 (gel ECR 15%) dan K5 (gel ECR 30%) ($p = 0,000$), yang menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak *Catharanthus roseus* mampu meningkatkan kadar GPx secara signifikan dibandingkan mencit yang hanya dipapar UVB tanpa perlakuan. Sebaliknya, tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif (K2) dengan kelompok kontrol positif (K3) ($p = 0,180$), serta antara kelompok perlakuan K4 dan K5 ($p = 0,288$). Hasil ini menunjukkan bahwa gel ekstrak bunga tapak dara, khususnya dosis 30%, memberikan efek peningkatan aktivitas antioksidan GPx yang sebanding dengan kelompok yang diberi vitamin E, dan mampu mendekati kadar GPx kelompok normal.

5.2 PEMBAHASAN

Paparan sinar UVB menyebabkan peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) baik secara lokal pada kulit maupun sistemik melalui

sirkulasi darah. ROS yang dihasilkan terutama berupa superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\bullet OH$). Molekul-molekul reaktif tersebut memicu stres oksidatif sistemik yang lebih cepat terdeteksi pada kompartemen darah dibandingkan pada jaringan kulit.⁷⁹

Aktivitas *Glutathione Peroxidase* (GPx) dalam serum menurun secara signifikan karena GPx merupakan enzim antioksidan utama dalam sirkulasi darah yang berfungsi menetralkan H_2O_2 menjadi H_2O dengan menggunakan glutathione tereduksi (GSH) sebagai donor elektron. Paparan ROS berlebih menyebabkan oksidasi residu selenocysteine pada pusat aktif GPx, sehingga menghambat fungsi katalitik enzim tersebut.^{80,81} Penurunan GPx serum mencerminkan terjadinya disfungsi redoks sistemik akibat paparan UVB yang menimbulkan peningkatan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β dari jaringan kulit yang rusak. Sitokin-sitokin ini menekan ekspresi gen GPx di hati dan menurunkan konsentrasi enzim yang dilepaskan ke sirkulasi.⁸²

Pemberian gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* meningkatkan kadar GPx secara bermakna pada kelompok perlakuan K4 dan K5 dibandingkan kelompok kontrol negatif. Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dalam ekstrak, terutama flavonoid, fenolik, dan alkaloid, memiliki kemampuan kuat dalam menstimulasi aktivitas enzim antioksidan serta menekan kerusakan oksidatif akibat paparan UVB.⁸³

Efek perlindungan yang dihasilkan oleh gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* konsentrasi 30% menunjukkan nilai yang paling optimal dan mendekati

kadar fisiologis kelompok normal. Temuan ini menandakan bahwa peningkatan dosis memberikan efek protektif yang lebih efektif terhadap stres oksidatif. Kandungan bioaktif dalam ekstrak berperan melalui mekanisme aktivasi jalur transkripsi Nrf2–ARE dan penghambatan jalur inflamasi NF- κ B, yang bersama-sama menjaga keseimbangan redoks seluler.⁸⁴

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa gel ekstrak bunga *Catharanthus roseus* memiliki efektivitas lebih baik dibandingkan vitamin E dalam meningkatkan kadar GPx dan melindungi kulit dari stres oksidatif akibat paparan sinar UVB. Keunggulan ini disebabkan oleh kandungan fitokimia kompleks seperti flavonoid, fenolik, dan alkaloid (vinblastin dan vinkristin) yang bekerja sinergis dalam menetralkan radikal bebas serta mengaktifasi jalur transkripsi Nrf2–ARE. Aktivasi jalur tersebut meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen, termasuk GPx, sehingga memperkuat sistem pertahanan redoks secara menyeluruh.⁸⁵

Vitamin E terutama berfungsi sebagai antioksidan lipofilik yang memutus rantai peroksidasi lipid di membran sel, namun tidak menstimulasi peningkatan enzim antioksidan.⁸⁶ Sebaliknya, ekstrak *Catharanthus roseus* memberikan efek protektif multi-target melalui peningkatan aktivitas antioksidan, penekanan stres oksidatif, dan penghambatan proses inflamasi. Kombinasi mekanisme ini menjadikan ekstrak bunga tapak dara lebih unggul dibandingkan vitamin E dalam memberikan perlindungan menyeluruh terhadap kerusakan kulit akibat radiasi UVB.^{85,87}

Peningkatan ekspresi MITF akibat paparan UVB merupakan respon adaptif yang baik dalam jangka pendek. MITF mengatur ekspresi gen penting dalam proses melanogenesis, seperti TYR, TYRP1, dan DCT, yang berperan dalam sintesis melanin. Aktivasi MITF membantu meningkatkan produksi melanin sebagai mekanisme proteksi seluler, karena melanin mampu menyerap radiasi UV dan menetralkan radikal bebas yang dihasilkan selama paparan sinar UVB.^{88,89} Peningkatan MITF awalnya merupakan mekanisme pertahanan alami kulit untuk mencegah kerusakan DNA dan stres oksidatif. Namun, aktivasi MITF yang berlebihan atau berkepanjangan dapat bersifat merugikan. Kelebihan ekspresi MITF menyebabkan hiperaktivasi melanosit dan peningkatan produksi melanin yang tidak terkendali, sehingga menimbulkan hiperpigmentasi dan ketidakseimbangan redoks di dalam sel. Stimulasi kronis MITF juga dapat mengganggu regulasi siklus sel dan meningkatkan risiko transformasi seluler, terutama pada kondisi stres oksidatif jangka panjang akibat paparan UV yang terus-menerus.⁹⁰ Peningkatan MITF saat kulit dipapar UVB tergolong baik bila bersifat sementara dan fisiologis, karena mendukung fungsi pertahanan kulit terhadap radiasi. Namun menjadi buruk bila peningkatan tersebut terjadi terus-menerus, karena dapat menyebabkan hiperpigmentasi, stres oksidatif kronis, dan potensi kerusakan sel kulit.⁹⁰

Perbandingan K4 pada dosis 15% dengan K3 yang diberikan vitamin E berbeda signifikan. Ekspresi MITF lebih tinggi pada kelompok yang diberikan vitamin E mulai mencapai titik ketika sifat pro-oksidan menjadi lebih dominan. Sel mengoksidasi sebagian vitamin E menjadi radikal tokoferoksil pada dosis ini.

Proses tersebut meningkatkan stres oksidatif lokal dan mengaktifkan jalur MAPK–p38/CREB. Aktivasi jalur tersebut mendorong ekspresi MITF secara lebih kuat dibandingkan dosis rendah karena ROS tetap berada pada level yang dianggap cukup tinggi oleh sel untuk memicu respons melanogenesis.⁹¹

Peningkatan K3 yang diberikan Vitamin E bersifat antioksidan pada kadar fisiologis, tetapi dalam kondisi stres oksidatif dapat teroksidasi menjadi radikal tokoferoksil yang bersifat pro-oksidan. Radikal ini meningkatkan peroksidasi lipid dan memperkuat aktivasi jalur MAPK serta CREB, sehingga ekspresi MITF tetap meningkat. Aktivasi reseptor endotelin B akibat UVB juga berperan dalam stimulasi jalur p38/CREB.⁹² Penyerapan vitamin E yang tidak merata menyebabkan sebagian ROS tetap aktif, memicu stres seluler tambahan. Aktivasi berlebih NRF2 pada kondisi redoks tidak seimbang turut meningkatkan MITF. Kombinasi efek UVB, radikal tokoferoksil, dan aktivasi jalur MAPK-CREB menjelaskan peningkatan MITF pada kelompok K3, menunjukkan bahwa vitamin E dapat bersifat pro-oksidan tergantung dosis dan kondisi sel.⁹³

Vitamin E bersifat antioksidan pada kadar fisiologis, tetapi dalam kondisi stres oksidatif tinggi dapat teroksidasi menjadi radikal tokoferoksil yang bersifat pro-oksidan. Radikal ini meningkatkan peroksidasi lipid dan memperkuat aktivasi jalur MAPK serta CREB, sehingga ekspresi MITF tetap meningkat. Aktivasi reseptor endotelin B akibat UVB juga berperan dalam stimulasi jalur p38/CREB.⁹² Penyerapan vitamin E yang tidak merata menyebabkan sebagian ROS tetap aktif, memicu stres seluler tambahan. Aktivasi berlebih NRF2 pada kondisi redoks tidak seimbang turut meningkatkan MITF. Kombinasi efek UVB, radikal tokoferoksil,

dan aktivasi jalur MAPK-CREB menjelaskan peningkatan MITF pada kelompok K3, menunjukkan bahwa vitamin E dapat bersifat pro-oksidan tergantung dosis dan kondisi sel.⁹³

Peningkatan ekspresi MITF pada kelompok perlakuan K4 (ECR 15%) dan K5 (ECR 30%) menunjukkan bahwa meskipun ekstrak *Catharanthus roseus* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, paparan UVB subkronis tetap menghasilkan sinyal oksidatif dan mediator melanotropik yang cukup untuk mempertahankan aktivasi MITF.⁹⁴ Temuan ini menegaskan bahwa respons melanogenesis terhadap antioksidan tidak bersifat linear, melainkan bergantung pada ambang ROS (ROS threshold), modulasi jalur Nrf2, dan fenomena hormesis fitokimia. Dengan demikian, meskipun terjadi penurunan stres oksidatif, sinyal upstream yang memicu MITF tetap aktif pada kadar tertentu.⁹⁵

Pada kelompok K4 yang diberikan gel ECR 15%, antioksidan mampu menurunkan sebagian ROS, namun tidak menurunkannya hingga level basal. ROS residual yang masih terbentuk akibat paparan UVB tetap cukup untuk mengaktifkan jalur MAPK-ERK dan p38-CREB yang berperan dalam fosforilasi dan stabilisasi MITF.⁹⁶ Selain itu, UVB tetap menstimulasi keratinosit untuk menghasilkan endothelin-1 (ET-1), yang kemudian mengaktifasi reseptor ETB pada melanosit dan memicu aktivasi p38 MAPK. Karena ekstrak ECR tidak menghambat pembentukan ET-1, jalur melanotropik ini tetap berjalan. Kombinasi sinyal ini menghasilkan peningkatan MITF yang tidak setinggi kelompok K3 tetapi tetap lebih tinggi dibanding kelompok normal. Kondisi ini menggambarkan fenomena “ROS threshold-dependent MITF activation”.^{96,97}

Kelompok K5 (ECR 30%), jumlah flavonoid dan senyawa fenolik yang lebih tinggi menghasilkan efek antioksidan yang lebih kuat sehingga ROS menurun lebih cepat. Penurunan ini memicu respons kompensasi seluler melalui aktivasi Nrf2, yang selain meningkatkan antioksidan endogen, juga dapat berinteraksi dengan faktor transkripsi lain seperti CREB. Aktivasi Nrf2–CREB crosstalk ini dapat memberikan stimulasi melanogenik ringan. Beberapa flavonoid seperti quercetin dan kaempferol juga telah terbukti dapat meningkatkan fosforilasi CREB, sehingga memberikan efek stimulasi terhadap MITF meskipun aktivitas tirosinase berkurang.⁹⁸ Fenomena dosis-menengah–tinggi flavonoid yang dapat bersifat stimulatif ini dikenal sebagai “*phytochemical biphasic effect* (hormesis)”, yang menjelaskan mengapa MITF pada K5 lebih tinggi daripada K4.⁹⁹

Pengaruh *Catharanthus roseus* terhadap tirosinase tidak selalu linier dengan efeknya terhadap MITF. Senyawa aktif dalam tanaman ini bekerja terutama sebagai inhibitor tirosinase dan antioksidan, tetapi tidak secara langsung menekan MITF. Karena itu, penurunan tirosinase dan penghambatan melanin dapat terjadi meskipun MITF masih meningkat ringan. Hal ini konsisten dengan laporan bahwa MITF pada level rendah hingga moderat tetap dapat muncul selama sinyal upstream seperti UVB, ROS residual, dan ET-1 masih ada.¹⁰⁰ Pada K4 dan K5, meskipun produksi melanin menurun akibat inhibisi tirosinase dan peningkatan kapasitas antioksidan seluler, ekspresi MITF tetap menunjukkan kenaikan ringan.

Peningkatan MITF pada K4 dan K5 merupakan konsekuensi dari kombinasi residual ROS, stimulasi ET-1, aktivasi p38–CREB, dan hormesis fitokimia. MITF tertinggi tetap ditemukan pada kelompok K3 (vitamin E) karena vitamin E

membentuk radikal tokoferoksil yang bersifat pro-oksidan, sehingga mengaktifkan p38–CREB lebih kuat dibanding ekstrak ECR. Fenomena ini menegaskan bahwa MITF tidak dapat dipandang sebagai satu-satunya indikator penurunan pigmentasi, karena *Catharanthus roseus* bekerja dominan pada tingkat tirosinase dan redoks seluler, bukan secara langsung pada MITF.

Keterbatasan durasi paparan sinar UVB selama 14 hari tergolong subkronis dan belum cukup untuk menimbulkan respons melanogenik yang nyata pada kulit mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi MITF pada kelompok kontrol negatif tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal, menandakan bahwa sistem pertahanan redoks endogen kulit masih mampu menetralkan radikal bebas yang terbentuk akibat paparan UVB. Aktivitas enzim antioksidan lokal seperti SOD, katalase, dan GPx epidermal turut mempertahankan kestabilan redoks selama periode tersebut. Durasi paparan yang relatif singkat ini juga menyebabkan aktivasi jalur MAPK–AP1 dan CREB tidak mencapai tingkat yang diperlukan untuk meningkatkan ekspresi MITF secara bermakna, sehingga perubahan ekspresi MITF belum sepenuhnya menggambarkan proses melanogenesis fisiologis yang biasanya terjadi pada paparan UVB jangka panjang. Selain itu, variasi dosis paparan UVB tidak diujikan secara bertingkat, sehingga kemungkinan adanya ambang dosis (UV dose–threshold) yang berbeda untuk memicu peningkatan MITF tidak dapat dievaluasi. Ketiadaan variasi dosis ini membatasi interpretasi hubungan antara intensitas UVB, stres oksidatif, dan aktivasi MITF, serta berpotensi menyembunyikan pola respons melanogenik yang lebih jelas.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) berpengaruh terhadap ekspresi MITF dan kadar GPx pada jaringan kulit mencit yang dipaparkan sinar UVB subkronis.
- b. Pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) berpengaruh meningkatkan ekspresi MITF pada jaringan kulit mencit yang dipaparkan sinar UVB subkronis
- c. Pemberian gel ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*) meningkatkan kadar GPx pada jaringan kulit mencit yang dipaparkan sinar UVB subkronis.

6.2. Saran

- a. Peneliti perlu memperpanjang durasi paparan UVB agar mencapai fase stres oksidatif kronis dan menimbulkan peningkatan ekspresi MITF yang signifikan.
- b. Evaluasi kadar melanin epidermal dan pemeriksaan histopatologi kulit diperlukan untuk memastikan perubahan pigmentasi secara morfologis dan fungsional.
- c. Studi berikutnya perlu menggunakan beberapa tingkat dosis UVB (rendah–sedang–tinggi) untuk menentukan pola respons MITF yang lebih

komprehensif dan memastikan apakah terdapat titik ambang (threshold) tertentu yang memicu aktivasi melanogenesis

- d. Analisis stabilitas, keamanan, dan daya penetrasi formulasi gel perlu dilakukan untuk mendukung pengembangan produk topikal berbasis ekstrak *Catharanthus roseus*.
- e. Kajian lanjutan terhadap jalur molekuler Nrf2–ARE dan MAPK–CREB diperlukan untuk memperkuat bukti mekanisme kerja antioksidan dan anti-melanogenik gel ekstrak *Catharanthus roseus*.



DAFTAR PUSTAKA

1. Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2016;412(1-2):101-110. doi:10.1007/s11010-015-2613-x
2. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus.* 2023;15(11). doi:10.7759/cureus.48840
3. Moolla S, Miller-Monthrope Y. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs Context.* 2022;11:1-14. doi:10.7573/dic.2021-11-2
4. Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34(6):1000-1014. doi:10.1111/pcmr.12986
5. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon.Elsevier Ltd.* 2023;9(3). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13580
6. Pham HNT, Vuong Q Van, Bowyer MC, Scarlett CJ. Phytochemicals Derived from *Catharanthus roseus* and Their Health Benefits. *Technologies (Basel).MDPI.* 2020;8(4). doi:10.3390/technologies8040080
7. Najukha Y, Yulianti E, Ferdinal F. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Bunga Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*). 2025;7(1):93-99.
8. Goboza M, Meyer M, Aboua YG, Oguntibeju OO. In vitro antidiabetic and antioxidant effects of different extracts of *catharanthus roseus* and its indole alkaloid, vindoline. *Molecules.* 2020;25(23). doi:10.3390/molecules25235546
9. Boo YC. Metabolic Basis and Clinical Evidence for Skin Lightening Effects of Thiol Compounds. *Antioxidants.* 2022;11(3). doi:10.3390/antiox11030503
10. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.Blackwell Publishing Ltd.* 2019;32(2):224-236. doi:10.1111/pcmr.12726
11. Nazhan Mahmood M. The Effectiveness of Glutathione on Skin Lightening: A Review. *Int J Med Sci.* 2022;5(2):2522-7386. <http://doi.org/10.32441.ijms.5.2.2>
12. Etnawati K, Adiwinarni DR, Susetiati DA, Sauchi Y, Ito H. The efficacy of skin care products containing glutathione in delivering skin lightening in Indonesian women. *Dermatol Reports.* 2019;11(S1). doi:10.4081/dr.2019.8013

13. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev.Hindawi Limited*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936
14. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. Published online 2017:147-153.
15. Leny L, Situmorang TNK, Siagian R, Hafiz I, Iskandar B. Ointment Formulation of Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) Flower Ethanol Extract and its Activity in Burn-Healing. *Borneo Journal of Pharmacy*. 2023;6(2):182-189. doi:10.33084/bjop.v6i2.3155
16. Bunyanis F, L.Ode W. Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*, (L) G. Don). *Journal of Health Educational Science And Technology*. 2023;6(1):39-46. doi:10.25139/htc.v6i1.5321
17. Zhang Q, Lu B, Li J. Design, synthesis and biological evaluation of 4-piperazinyl-containing Chidamide derivatives as HDACs inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(14):3162-3166. doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.026
18. Scaria B, Sood S, Raad C, et al. Natural health products (NHP's) and natural compounds as therapeutic agents for the treatment of cancer; mechanisms of anti-cancer activity of natural compounds and overall trends. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1-32. doi:10.3390/ijms21228480
19. Saeedi M, Khezri K, Seyed Zakaryaei A, Mohammadamini H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytotherapy Research*. 2021;35(8):4136-4154. doi:10.1002/ptr.7076
20. Lahare Rajeshwari Prabha, Yadav HS, Bisen YK, Dashahre AK. Estimation of Total Phenol, Flavonoid, Tannin and Alkaloid Content in Different Extracts of *Catharanthus roseus* from Durg District, Chhattisgarh, India. *Scholars Bulletin*. 2021;7(1):1-6. doi:10.36348/sb.2021.v07i01.001
21. Santi E, Budianto WY, Nursantari W, Ruffaida FS, Sari IA. *Catharanthus roseus* anti-inflammatory action : A systematic review protocol of in vivo and in vitro studies. 2023;8(2):10-12.
22. 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(5):1-34. doi:10.3390/ijms26052278
23. Liu JK. Natural products in cosmetics. *Nat Prod Bioprospect*. 2022;12(1). doi:10.1007/s13659-022-00363-y
24. Al-bari A, Saputri RK, Jannah SR. Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.) Sebagai Tabir Surya dalam Menghambat Pembentukan Eritema. *SEHATI: Jurnal Kesehatan*. 2023;3(1):30-34. doi:10.52364/sehati.v3i1.34

25. Amalia MR, Subchan P. Effect of Petai Skin Extract Gel Administration on MITF Gene Expression and Melanin Count (in Vivo Experimental Study on Hyperpigmented Wistar Mice Exposed to UVB Exposed Hyperpigmentation). *International Journal of Multidisciplinary Research and Analysis*. 2023;6(12):5842-5853. doi:10.47191/ijmra/v6-i12-50
26. Santhi AAWK. Pengaruh gel ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) terhadap kepadatan kolagen pada penyembuhan pasca luka insisi gingiva tikus Wistar(*Rattus norvegicus*). 2023;11(1):1-14. http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEMBETUNGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI
27. Satish AM, M. K J, Gangadhar TV, Ramu R. Evaluation of Wound Healing Activity of *Catharanthus Roseus* Aqueous Extract in Adult Albino Rats. *Int J Life Sci Pharma Res*. 2021;11(2):146-152. doi:10.22376/ijpbs/lpr.2021.11.2.p146-152
28. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019;32(2):224-236. doi:10.1111/pcmr.12726
29. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Laboratory Investigation*. 2017;97(6):649-656. doi:10.1038/labinvest.2017.9
30. Yoo DH, Joo DH, Lee JY. Anti-oxidant Function and Inhibitory Effects of the Expression of MITF, TRP-1, TRP-2 and Tyrosinase of *Sesamum indicum* L. in B16F10 Melanoma Cells. *J Life Sci*. 2017;27(3):318-324. doi:10.5352/jls.2017.27.3.318
31. Mattson MP. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev*. 2007;7(1):1. doi:10.1016/J.ARR.2007.08.007
32. Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D'Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:1208690. doi:10.1155/2021/1208690
33. Estrada C, Mirabal-Ortega L, Méry L, et al. MITF activity is regulated by a direct interaction with RAF proteins in melanoma cells. *Commun Biol*. 2022;5(1):101. doi:10.1038/S42003-022-03049-W
34. Fang D, Tsuji Y, Setaluri V. Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(14):3096-3106. doi:10.1093/NAR/GKF424
35. Jenkins NC, Grossman D. Role of Melanin in Melanocyte Dysregulation of Reactive Oxygen Species. *Biomed Res Int*. 2013;2013:908797. doi:10.1155/2013/908797

36. Kline CD, Anderson M, Bassett JW, et al. MITF Is Regulated by Redox Signals Controlled by the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1. *Cancers (Basel)*. 2022;14(20):5011. doi:10.3390/CANCERS14205011/S1
37. Mucha M, Skrzydlewska E, Gęgotek A. Natural protection against oxidative stress in human skin melanocytes. *Communications Biology* 2025 8:1. 2025;8(1):1283-. doi:10.1038/s42003-025-08725-1
38. Marrapodi R, Bellei B. The Keratinocyte in the Picture Cutaneous Melanoma Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2024;16(5). doi:10.3390/cancers16050913
39. Flesher JL, Paterson-Coleman EK, Vasudeva P, et al. Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2020;33(2):279-292. doi:10.1111/pcmr.12828
40. Guida S, Guida G, Goding CR. MC1R Functions, Expression, and Implications for Targeted Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2022;142(2):293-302.e1. doi:10.1016/j.jid.2021.06.018
41. Chen T, Zhao B, Liu Y, et al. MITF-M regulates melanogenesis in mouse melanocytes. *J Dermatol Sci*. 2018;90(3):253-262. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.02.008
42. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. *Antioxidants*. 2021;10(7):1-22. doi:10.3390/antiox10071129
43. Madelaine R, Ngo KJ, Skariah G, Mourrain P. Genetic deciphering of the antagonistic activities of the melanin-concentrating hormone and melanocortin pathways in skin pigmentation. *PLoS Genet*. 2020;16(12):1-21. doi:10.1371/journal.pgen.1009244
44. Dall'Olmo L, Papa N, Surdo NC, Marigo I, Mocellin S. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH): biology, clinical relevance and implication in melanoma. *J Transl Med*. 2023;21(1):1-9. doi:10.1186/s12967-023-04405-y
45. Chen J, Liu Y, Zhao Z, Qiu J. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. *Int J Cosmet Sci*. 2021;43(5):495-509. doi:10.1111/ics.12728
46. Sultana H, Seo D, Choi NR, et al. Identification of polymorphisms in MITF and DCT genes and their associations with plumage colors in Asian duck breeds. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2018;31(2):180-188. doi:10.5713/ajas.17.0298
47. Byeon JH, Alam MB, Kim KC, et al. Anti-melanogenic effect of chestnut spike extract through downregulation of tyrosinase-related proteins and activation of ERK 1/2. *Nat Prod Commun*. 2018;13(8):1023-1026. doi:10.1177/1934578x1801300825
48. Zhao W, Yang A, Wang J, et al. Potential application of natural bioactive compounds as skin-whitening agents: A review. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(12):6669-6687. doi:10.1111/jocd.15437

49. Masum MN, Yamauchi K, Mitsunaga T. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents. *Reviews in Agricultural Science*. 2019;7:41-58. doi:10.7831/ras.7.41
50. Yun CY, Roh E, Kim SH, et al. Stem cell factor-inducible MITF-M expression in therapeutics for acquired skin hyperpigmentation. *Theranostics*. 2020;10(1):340-352. doi:10.7150/thno.39066
51. Vašková J, Kočan L, Vaško L, Perjési P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. 2023;28(3). doi:10.3390/molecules28031447
52. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation. *Front Pharmacol*. 2023;14(March):1-14. doi:10.3389/fphar.2023.1147414
53. Sasaninia K, Kelley M, Abnousian A, et al. Topical Absorption of Glutathione–Cyclodextrin Nanoparticle Complex in Healthy Human Subjects Improves Immune Response against *Mycobacterium avium* Infection. *Antioxidants*. 2023;12(7). doi:10.3390/antiox12071375
54. Ulasan S, Mahmood MN, Terapan DK, Terapan FS, Samarra U. Khasiat Glutathione dalam Mencerahkan Kulit : 2022;5(2):5-16.
55. Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S. Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*. 2014;4(1):1. doi:10.5455/spatula.20140131074751
56. Costa EF, Magalhães W V., Di Stasi LC. Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. *Molecules.MDPI*. 2022;27(21). doi:10.3390/molecules27217518
57. Sonthalia S, Daulatabad D, Sarkar R. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016;82(3):262-272. doi:10.4103/0378-6323.179088
58. Nejat N, Valdiani A, Cahill D, Tan YH, Maziah M, Abiri R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb. *Scientific World Journal*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/982412
59. Mishra JN, Verma NK. A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017;2(2):2455-2698.
60. Chaturvedi V, Goyal S, Mukim M, et al. A Comprehensive Review on *Catharanthus roseus* L. (G.) Don: Clinical Pharmacology, Ethnopharmacology and Phytochemistry. *Journal of Pharmacological Research and Developments*. 2022;4(2):17-36. doi:10.46610/jprd.2022.v04i02.003

61. Al-Shmgani HSA, Mohammed WH, Sulaiman GM, Saadoon AH. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Catharanthus roseus* leaf extract and assessing their antioxidant, antimicrobial, and wound-healing activities. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(6):1234-1240. doi:10.1080/21691401.2016.1220950
62. Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, et al. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-34530-4
63. Samodra G. ORIGINAL ARTICLE Test The Effectiveness Of *Catharanthus roseus* Leaf Extract On Healing Incision Wounds On Rabbit Back Skin Uji Efektivitas Ekstrak Daun Tapak Dara Terhadap Penyembuhan Luka Sayat Pada Kulit Punggung Kelinci Abstrak Pendahuluan. 2024;000:608-615.
64. Pahadiya Anitakumari Rambhai, Dr. S.S. Sisodia, Arijit Chaudhuri, Arpit Patidar. Antiulcer and Antihyperlipidaemic Efficacy of *Catharanthus roseus* Leaves on pylorus ligation induced Ulcer in Experimental Animals. *Pharmaceutical and Biosciences Journal.* Published online July 9, 2019:07-12. doi:10.20510/ukjpb/7/i4/185558
65. Qian W, Liu W, Zhu D, et al. Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review). *Exp Ther Med.* 2020;20(1):173-185. doi:10.3892/etm.2020.8687
66. Rai V, Tandon PK, Khatoon S. Effect of chromium on antioxidant potential of *Catharanthus roseus* varieties and production of their anticancer alkaloids: Vincristine and vinblastine. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/934182
67. Ramayanti R, Rachmawati NA, Azhar Z, Nik Azman NH. Exploring intention and actual use in digital payments: A systematic review and roadmap for future research. *Computers in Human Behavior Reports.* 2024;13(August 2023):100348. doi:10.1016/j.chbr.2023.100348
68. Desai SR. Hyperpigmentation therapy: A review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology.* 2014;7(8):13-17.
69. Arnanda QP, Nuwarda RF. Penggunaan Radiofarmaka Teknisium-99M Dari Senyawa Glutation dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Farmaka Suplemen.* 2019;14(1):1-15. <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/22071>
70. Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol.* 2019;28(October 2018):23-27. doi:10.1111/exd.13818
71. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):1-14. doi:10.1101/cshperspect.a015370
72. Markiewicz E, Karaman-Jurukovska N, Mammone T, Idowu OC. Post-Inflammatory Hyperpigmentation in Dark Skin: Molecular Mechanism and

- Skincare Implications. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2022;15(November):2555-2565. doi:10.2147/CCID.S385162
73. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm Venereol. Medical Journals/Acta D-V*. 2018;98(10):924-931. doi:10.2340/00015555-3002
 74. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci*. 2009;10(9):4066-4087. doi:10.3390/ijms10094066
 75. Cui X, Mi T, Zhang H, et al. Glutathione amino acid precursors protect skin from UVB-induced damage and improve skin tone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2024;38(S3):12-20. doi:10.1111/jdv.19718
 76. Al-bari A, Saputri RK, Jannah SR. Evaluasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.) Sebagai Tabir Surya dalam Menghambat Pembentukan Eritema. *SEHATI: Jurnal Kesehatan*. 2023;3(1):30-34. doi:10.52364/sehati.v3i1.34
 77. Bunyanis F, L.Ode W. Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*, (L) G. Don). *Journal of Health Educational Science And Technology*. 2023;6(1):39-46. doi:10.25139/htc.v6i1.5321
 78. Howe PH, Limper AH. *Detection of TGFβ in Body Fluids and Tissues. Transforming Growth Factor-Beta Protocols*. Vol 142.; 2000.
 79. McGlone CL, Christian L, Schmeusser B, et al. Evidence for Systemic Reactive Oxygen Species in UVB-mediated Microvesicle Formation. *Photochem Photobiol*. 2021;98(1):242. doi:10.1111/PHP.13494
 80. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957. doi:10.1089/ARS.2010.3586
 81. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation. *Front Pharmacol*. 2023;14:1147414. doi:10.3389/FPHAR.2023.1147414
 82. Lubos E, Kelly NJ, Oldebeken SR, et al. Glutathione Peroxidase-1 Deficiency Augments Proinflammatory Cytokine-induced Redox Signaling and Human Endothelial Cell Activation. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35407. doi:10.1074/JBC.M110.205708
 83. Zahra M, Abrahamse H, George BP. Flavonoids: Antioxidant Powerhouses and Their Role in Nanomedicine. *Antioxidants*. 2024;13(8):922. doi:10.3390/ANTIOX13080922
 84. Interdonato L, Ferrario G, Cordaro M, et al. Targeting Nrf2 and NF-κB Signaling Pathways in Inflammatory Pain: The Role of Polyphenols from Thinned Apples. *Molecules*. 2023;28(14):5376. doi:10.3390/MOLECULES28145376/S1

85. Hira FA, Islam A, Mitra K, et al. Comparative Analysis of Phytochemicals and Antioxidant Characterization Among Different Parts of *Catharanthus roseus*: In Vitro and In Silico Investigation. *Biochem Res Int.* 2024;2024(1):1904029. doi:10.1155/2024/1904029
86. Chen M, Ghelfi M, Poon JF, et al. Antioxidant-independent activities of α -tocopherol. *Journal of Biological Chemistry.* 2025;301(4):108327. doi:10.1016/J.JBC.2025.108327
87. Hashim M, Arif H, Tabassum B, et al. An overview of the ameliorative efficacy of *Catharanthus roseus* extract against Cd²⁺ toxicity: implications for human health and remediation strategies. *Front Public Health.* 2024;12:1327611. doi:10.3389/FPUBH.2024.1327611
88. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;32(2):224. doi:10.1111/PCMR.12726
89. Gelmi MC, Houtzagers LE, Strub T, Krossa I, Jager MJ. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):6001. doi:10.3390/IJMS23116001
90. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, et al. Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. *J Skin Cancer.* 2011;2011:730170. doi:10.1155/2011/730170
91. Kaye AD, Thomassen AS, Mashaw SA, et al. Vitamin E (α -Tocopherol): Emerging Clinical Role and Adverse Risks of Supplementation in Adults. *Cureus.* 2025;17(2):e78679. doi:10.7759/CUREUS.78679
92. Shetty RA, Ikonne US, Forster MJ, Sumien N. Coenzyme Q10 and α -tocopherol reversed age-associated functional impairments in mice. *Exp Gerontol.* 2014;0:208. doi:10.1016/J.EXGER.2014.08.007
93. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants.* 2022;11(12):2345. doi:10.3390/ANTIOX11122345
94. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;32(2):224. doi:10.1111/PCMR.12726
95. Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, et al. Hormesis and Oxidative Distress: Pathophysiology of Reactive Oxygen Species and the Open Question of Antioxidant Modulation and Supplementation. *Antioxidants.* 2022;11(8):1613. doi:10.3390/ANTIOX11081613
96. Tagashira H, Miyamoto A, Kitamura SI, et al. UVB 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(6):e0128678. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0128678
97. Jamal S, Schneider RJ. UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest*. 2002;110(4):443. doi:10.1172/JCI13729
 98. Pallauf K, Duckstein N, Hasler M, Klotz LO, Rimbach G. Flavonoids as Putative Inducers of the Transcription Factors Nrf2, FoxO, and PPAR γ . *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:4397340. doi:10.1155/2017/4397340
 99. Muchtaridi M, Az-Zahra F, Wongso H, Setyawati LU, Novitasari D, Ikram EHK. Molecular Mechanism of Natural Food Antioxidants to Regulate ROS in Treating Cancer: A Review. *Antioxidants*. 2024;13(2):207. doi:10.3390/ANTIOX13020207
 100. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;32(2):224. doi:10.1111/PCMR.12726

