

DISERTASI

Efek Fotoprotektif Krim Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mongostana L*) Terhadap 8-OHdG, CPD dan Expresi Gen MMP-1 Setelah Paparan UVB Pada Mencit Albino

Effect of Photoprotective Cream of Mangosteen Pericarp Extract (*Garcinia Mongostana L*) Against 8-OHdG, CPD dan Expression MMP-1 Gene After UVB Exposure On Albino Mice



**Dian Amelia Abdi
(P0200315404)**

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

DISERTASI

EFEK FOTOPROTEKTIF KRIM EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*GARCINIA MANGOSTANA L*) TERHADAP 8-OHDG, CPD DAN EKSPRESI GEN MMP-1 SETELAH PAPARAN UVB PADA MENCIT ALBINO

Disusun dan diajukan oleh

Dian Amelia Abdi
P0200315404

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 5 Januari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,


Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK
Promotor

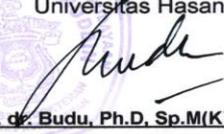

Dr. dr. Khairuddin Djiawad, Sp.KK(K)
Ko-Promotor


Dr. dr. Sri Vitayani M, Sp.KK(K)
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin


dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed

ABSTRAK

DIAN AMELIA ABDI. *Efek Fotoprotektif Krim Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia Mangostana L) terhadap 8-OHdG, CPD dan Ekspresi Gen MMP-1 setelah Paparan UVB pada Mencit Albino (dibimbing oleh Nasrum Massi, Khairuddin Djawad, Sri Vitayani).*

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh aplikasi krim ekstrak kulit manggis (*Garcinia L Mangostana*) terhadap kadar 8-OHdG, CPD dan MMP-1 pada kulit mencit setelah paparan sinar UVB.

Pengujian secara *invivo* dilakukan dengan membagi mencit menjadi 5 kelompok yaitu kelompok 1 hanya disinari dengan UVB, kelompok 2 dioleskan basis krim dan disinari UVB, kelompok 3 dioleskan krim ekstrak kulit manggis 1 % dan disinari UVB, kelompok 4 dioleskan krim ekstrak kulit manggis 3 % kemudian disinari UVB dan kelompok 5 dioleskan ekstrak kulit manggis 5 % kemudian disinari UVB. Sebelum dan setelah periakuan diuji kadar 8-OHdG, CPD dan ekspresi MMP-1, kemudian dilakukan pemeriksaan ketebalan dan kerapatan kolagen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengolesan krim ekstrak kulit manggis pada konsentrasi 5 % tidak terdapat perbedaan bermakna dengan pengolesan *basecream*. Hal ini dapat dilihat pada uji statistik yang memperlihatkan penurunan yang signifikan kadar 8-OHdG, CPD dan ekspresi MMP-1 pada mencit yang dioleskan krim ekstrak manggis 5 % dan *basecream*. Pengukuran ketebalan kolagen tidak didapatkan perbedaan bermakna pada ke-5 kelompok, tetapi didapatkan terjadi peningkatan kerapatan kolagen pada konsentrasi 5 %. Krim ekstrak kulit manggis pada konsentrasi 5 % dapat menghambat pembentukan ROS dan meningkatkan kerapatan kolagen.

Kata kunci : Ekstrak Kulit Manggis, *Garcinia mangostana L*, Kulit Mencit 8-OHdG, CPD, MMP-1, Kolagen



ABSTRACT

DIAN AMELIA ABDI. *Effect of Photoprotective Cream of Mangosteen Pericarp Extract (Garcinia Mangostana L) against 8-OHdG, CPD and Expression MMP-1 Gene after UVB Exposure on Albino Mice* (Supervised by **Nasrum Massi, Khairuddin Djawad, and Sri Vitayani**)

This study aims to determine the effect of the application of mangosteen peel extract cream (*Garcinia Mangostana L*) on levels of 8-OHdG, CPD and MMP-1 on the skin of mice after exposure to UVB.

Invivo testing was carried out by dividing the mice into 5 group namely: group 1 was only exposed to UVB, group 2 was applied with a cream base and exposed to UVB, group 3 was rubbed with 1% mangosteen pericarp extract cream and exposed to UVB, group 4 was rubbed with 3% mangosteen pericarp extract cream then irradiated with UVB and group 5 smeared with 5% mangosteen pericarp extract then exposed to UVB. Before and after treatment, levels of 8-OHdG, CPD, and MMP-1 expression were tested, then the collagen thickness and density were examined.

The application of mangosteen peel extract cream at a concentration of 5% is not significantly different from basecream application, this can be seen in statistical tests which show a significant reduction in levels of 8-OHdG, CPD and MMP-1 expression in mice smeared with 5% mangosteen pericarp extract cream and basecream. In the measurement of collagen thickness there is no significant difference in the five groups, but there is an increase in collagen density at the concentration of 5%. Mangosteen pericarp extract cream at a concentration of 5% can inhibit the formation of ROS and increase collagen density.

Keywords: Mangosteen pericarp extract, *Garcinia mangostana L*, Mice skin, 8-OHdG, CPD, MMP-1, Collagen





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp. (0411)586010, (0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN NON PLAGIAT

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dian Amelia Abdi

No Pokok : P0200315404

Program Pendidikan : Doktor (S3)

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan secara benar, jujur dan bertanggung jawab bahwa disertasi yang berjudul "Efek Fotoprotektif Krim Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) terhadap 8-OHdG, CPD dan Ekspresi Gen MMP-1 setelah Paparan UVB pada Mencit Albino" adalah **asli dan bukan plagiat/bebas dari plagiat**.

Jika dikemudian hari ternyata disertasi ini sebagian/seluruhnya mengandung unsur plagiat maka disertasi dibatalkan dan bersedia menerima sanksi secara hukum dari Fakultas maupun Universitas.

Demikian Surat Pernyataan ini dibuat tanpa tekanan siapapun.

Makassar, 30 Desember 2020

Mahasiswa,



Dian Amelia Abdi

DAFTAR TIM PENGUJI

1. Prof. dr. Nasrum Massi, PhD, Sp.MK Promotor/Penguji
2. Dr. dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K) FINS DVKo-Promotor/Penguji
3. Dr.dr. Sri Vitayani, Sp.KK(K), FINS DVKo-Promotor/Penguji
4. Dr. Andi Emelda, S.Si., M.Si., AptPenguji
5. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)Penguji
6. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si, AptPenguji
7. dr. Upik Anderiani Miskad, Sp.PA(K), Ph.DPenguji
8. Dr.dr. Ilham Jaya Patellongi, M.KesPenguji

DAFTAR ISI

Contents

BAB I.....	9
PENDAHULUAN.....	13
I.1. Latar Belakang Masalah	13
I.2. Rumusan Masalah.....	18
I.3. Tujuan Penelitian	18
I.3.1 Tujuan Umum.....	18
I.3.2 Tujuan Khusus	18
I.4. Hipotesis Penelitian	19
I.5. Manfaat Penelitian	19
BAB II	21
TINJAUAN PUSTAKA	21
II.1. Sinar Matahari dan Ultraviolet	21
II.2. Dampak Sinar Ultraviolet.....	22
II.2.1 Efek akut ultraviolet.....	23
II.2.2. Efek Kronis Ultraviolet	25
II.3. Efek sinar UV pada matriks ekstraseluler dermis.....	26
II.4. Radikal Bebas	30
II.4.1 Definisi.....	30
II.4.2 Jenis dan sumber radikal bebas	30
II.4.3. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG).....	34
II.4.4. Cyclobutamin Pyrimidine Dimers (CPD).....	35
II.4.5. Matriks Mettaloproteinase 1 (MMP-1).....	36
II.4.6 Kolagen	36
II.5. Manggis.....	39
II.5.1. Karakteristik manggis	40
II.5.2. Klasifikasi dan Identifikasi	41
II.5.3. Pemanfaatan Kulit Buah Manggis	42
II.5.4. Kandungan	43
II.5.5. Aktivitas biologis	45
II.6. MENCIT(Mus musculus)	48
II.7. KERANGKA TEORI	51
II.8. KERANGKA KONSEP	53
BAB III	54
METODE PENELITIAN	54
III.1. Rancangan Penelitian	54
III.2. Tempat dan Waktu Penelitian	54
III.3. Populasi Penelitian	54
III.4. Sampel Penelitian	54
III.4.1 Besar sampel	54
III.4.2. Kriteria sampel	55
III.5. Alat dan Bahan.....	56
III.6. Cara Kerja	56
III.6.1 Paparan UVB pada Mencit	56

III.6.2.	Pembuatan ekstrak kulit buah manggis	57
III.6.3.	Pemeriksaan ELISA 8-OHdG (MBS263767).....	58
III.6.4.	Pemeriksaan ELISA CPD (MBS283314)	58
III.6.5.	Pengukuran Ekspresi mRNA MMP-1 (Makrogen).....	59
III.6.6.	Analisis ekspresi mRNA MMP-1(Zhang dkk, 2014)	60
III.6.7.	Pemeriksaan Histopatologi	61
III.7.	Definisi Operasional.....	63
III.8.	Izin Penelitian dan Kelayakan Etik (Ethical Approval)	65
III.9.	Alur Penelitian.....	66
BAB IV	67
HASIL PENELITIAN	67
IV.1.	Hasil Penelitian 8-OHdG, CPD dan ekspresi MMP-1	68
IV.2.	Distribusi Sebaran Ketebalan Kolagen.....	73
IV.3.	Distribusi Sebaran Kepadatan Kolagen.....	76
BAB V	78
PEMBAHASAN	78
V.1.	Karakteristik sampel.....	78
V.2.	Efek krim ekstrak kulit manggis terhadap kadar CPD, 8-OHdG dan ekspresi MMP-1	81
V.3.	Efek ekstrak kulit buah manggis terhadap ketebalan dan kepadatan kolagen.....	84
BAB VI	86
PENUTUP	86
VI.1	Kesimpulan	86
VI.2.	Saran.....	87
DAFTAR PUSTAKA	88
LAMPIRAN	96

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim. Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji bagi Allah SWT atas seluruh berkah dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat selesai. Saya mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah berperan sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini yang merupakan salah satu persyaratan akademik guna memperoleh gelar Doktor dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyelesaian disertasi ini telah melibatkan berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, perorangan maupun Lembaga yang telah memberikan kontribusi dalam penyelesaian penyusunan Disertasi ini. Untuk itu dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang penulis hormati :

Pertama, **Prof. dr. Nasrum Massi, PhD, Sp.MK** selaku Promotor, **Dr.dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K), FINS DV, FAADV** selaku Ko-Promotor dan **Dr. dr. Sri Vltayani M, Sp.KK(K), FINS DV, FAADV** selaku Ko-Promotor, melalui beliau beliau lah dengan kepakarannya telah meluangkan waktu dan memberikan kontribusi bagi terwujudnya disertasi ini. Dengan kesabaran, perhatian dan keikhlasan telah memberikan dorongan, koreksi dan saran dari aspek metodologi penelitian maupun pengkajian isi disertasi secara keseluruhan, sehingga membuka cakrawala/pandangan, mendorong

munculnya gagasan, ide-ide pembaharuan khususnya dalam bidang Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Kulit. Untuk itulah penulis menghaturkan sekali lagi penghormatan dan penghargaan yang setinggi-tingginya serta mengucapkan terima kasih dengan iringan doa semoga amal beliau diterima dan mendapatkan balasan dari Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Pemurah.

Kedua kepada Ibu **Dr. Andi Emelda, S.Si., M.Si., Apt, Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K), Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt, dr. Upik Anderiani Miskad, Sp.PA(K), Ph.D., Dr.dr. Ilham Jaya Patellongi, M.Kes** selaku penguji yang telah memberikan koreksi, saran demi kesempurnaan penelitian ini. Penulis menghaturkan terima kasih dengan iringan doa semoga amal beliau diterima dan mendapatkan balasan dari Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Pemurah.

Ketiga kepada Ayahanda **H. Abdi Tunggal** dan Ibunda **Hj. Juliani Jafar**, yang merupakan guru besar penulis yang setiap saat memberikan nasihat, dorongan dan doa kepada penulis sekeluarga. Kupanjatkan doa kepadamu Ya Allah, Ampunilah dosa-dosaku dan dosa kedua orang tuaku dan kasihanilah keduanya sebagaimana mereka mengasihaniiku sewaktu aku kecil.

Keempat teristimewa buat suami, Irvan Darmawan, ST, MT. dan anak-anakku Filzah, Habibie, Aimar dan kembarku Adiva dan Aqilla yang sabar menanti ibunya bisa bermain bersama mereka dan menjadi penyemangatku. Adik-adikku Sesy, Tiwi dan Idham terkhusus Sesy yang telah memberikan

semangat dan bantuan tenaga dalam menjaga anak-anakku. Doa dan cinta selalu tulus untuk kebaikan dan keberkahan dari Allah SWT.

Kelima, kepada pimpinan Fakultas Kedokteran UMI, terkhusus Ayahanda Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Sp.PA(K), PhD, DFM yang telah memberikan nasihat, wejangan dan dorongan serta kepada teman teman dosen FK UMI, dr. Nesyana, dr. Nurfachanti, dr. Dwi Anggita, dr. Edward Pandu, Sp.P dan dr. Sri Wahyu atas semangatnya.

Kepada teman-teman mahasiswa S3 angkatan 2015 Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang sudah saling memberi semangat dan dorongan serta doa agar kami semua bisa sampai ketitik ini.

Teruntuk tim Laboratorium Mikrobiologi Unhas, tim Laboratorium Patologi Anatomi, dan tim laboratorium Farmasetika Politeknik Farmasi Makassar atas fasilitas laboratorium yang memadai sehingga penulis dapat meneliti dengan baik.

Teman-teman Dermatovenereology, dr. Widya Widita, dr. Monalisa, dr. Soraya Bakri, dan dr. Triani Hastuti atas doa dan dorongan semangatnya. Rindu Ngumpul dengan Kalian.

Penulis menyadari bahwa penyusunan disertasi ini masih banyak kekurangan, permasalahan tentang *photoaging* masih dibutuhkan lebih dalam. Semoga disertasi ini dapat memberi manfaat dalam ilmu Kedokteran dan dapat dijadikan salah satu rujukan bagi peneliti atau penulis karya ilmiah

lainnya. Akhirkata penulis berbesar hati apabila para pembaca dapat memberikan saran dan kritik dalam rangka proses penelitian berikutnya.

Makassar, Oktober 2020

Penulis

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Sinar surya (SS) merupakan energi elektromagnetis yang dipancarkan dalam bentuk gelombang, mulai dari sinar X yang bergelombang sangat pendek dan berenergi tinggi sampai gelombang radio yang bergelombang panjang dan berenergi sangat rendah. Spektrum SS pada permukaan bumi terdiri dari sinar bergelombang 290 – 3000 nm yang tersusun oleh : sinar ultraviolet /SUV (290 – 400 nm), sinar kasat mata (400 – 760 nm) dan sinar inframerah (760 – 3000 nm). Sinar UV dibedakan dalam tiga macam sinar yaitu; UVA (320 – 400 nm), UVB (290 – 320 nm) dan UVC (< 290 nm). Sebagian kecil SUVA diabsorpsi di atmosfer sehingga spektrum SUV yang mencapai permukaan bumi pada saat tengah hari terdiri dari : sekitar 10% SUVB dan 90% SUVA. Intensitas SUVB akan menurun setelah mencapai puncaknya pada siang hari, tetapi SUVA relatif konstan (Epstein, 1997).

Dampak buruk paparan SS pada kulit manusia dapat berupa dampak yang akut maupun dampak yang kronik, akibat rangkaian proses fotokimiawi dan fotobiologis pada sel-sel kulit yang menyerap energi tersebut. Dampak akut paparan SS terjadi akibat paparan tunggal berenergi tinggi yang dapat berupa respon eritem dan pigmentasi lambat. Sekitar 98 – 99% respon eritem terjadi setelah paparan UVB dan mencapai puncaknya 12 – 24 jam setelah paparan (Epstein, 1997), dapat diperiksa secara histologik yang dikenal sebagai sel *sunburn* atau sel apoptosis. Dampak kronik terjadi akibat paparan

berulang dengan energi rendah, berupa prekanker, kanker kulit dan penuaan dini. Panjang gelombang SS yang paling efektif menimbulkan kanker kulit non melanoma adalah dalam kisaran UVC dan UVB, tetapi sinar UVC diabsorpsi oleh lapisan ozon sehingga tidak sampai dipermukaan bumi. Meskipun panjang gelombang UVB paling karsinogenik, penelitian pada binatang percobaan membuktikan bahwa UVA juga mampu menimbulkan kanker kulit. tetapi dibanding dengan UVB, UVA membutuhkan paparan yang jauh lebih besar dan periode laten paparan lebih lama sebelum tampak kanker kulit sehingga UVB paling sering digunakan pada penelitian fotokarsinogenesis pada binatang (Katiyar, 1999).

Oksigen penting dalam proses kehidupan kita, namun sekitar 5 % atau lebih dari oksigen yang dihirup akan menjadi Reactive oxygen species (ROS) yang merupakan bahan kimia reaktif yang mempunyai elektron tunggal berpasangan pada orbitnya dan biasanya menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif melalui reaksi dengan molekul yang berdekatan seperti protein, lemak, karbohidrat dan asam nukleat, yang terdiri dari superoxide radical anion (O_2^-), carbondioxide free radical (CO_2), hydroxyl free-radical (OH) dan hydrogen peroxide (H_2O_2), (Kunwar.,2011, Costa 2014).

Deoxyribonucleic acid sangat sensitif terhadap serangan ROS dan kerusakan DNA ditemukan pada berbagai kanker jaringan yang diperantarai oleh radikal bebas. Tidak semua ROS dapat menyebabkan kerusakan DNA dan hydroxyl radical merupakan satu-satunya ROS yang dapat bereaksi dengan semua komponen molekul DNA dan menyebabkan kerusakan DNA

seperti modifikasi basa DNA, kerusakan untai tunggal dan ganda DNA, kehilangan purin, kerusakan gula deoksiribosa, DNA-protein cross linkage dan kerusakan sistem perbaikan DNA (Grigorov.,2012. Kunwar.,2011). Produk yang paling banyak mencerminkan kerusakan oksidatif DNA adalah 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), yang merupakan produk modifikasi oksidatif basa guanin DNA yang mutagenik dalam sel bakteri dan mamalia. Penilaian produk kerusakan oksidatif DNA (8-OHdG) pada berbagai material biologi seperti serum atau urin, merupakan hal yang sangat penting untuk mengetahui peran stress oksidatif dalam menyebabkan perkembangan kanker dan intervensi penyakit (Klaunig.,2010)

Reaksi kronis dari paparan sinar ultraviolet matahari dapat menimbulkan gangguan tekstur kulit, penuaan dini (photoaging) dan kanker kulit (Walker et al., 2008; Quan et al., 2009). Kerusakan yang ditimbulkan atas sinar UV dapat dilihat baik secara klinis, histologi, patologi anatomi maupun secara fungsional (Berneburg et al 2000)/ Paparan radiasi UV sinar matahari menyebabkan kerusakan kulit melalui beberapa mekanisme, termasuk pembentukan sunburn cell, tercetusnya respon imun peradangan, terbentuknya thymine dimer dan produksi kolagenase (Matriks Metaloproteinase) (Baumann & Saghari, 2009). MMP adalah enzyme proteinase mengandung zinc, yang bertanggung jawab mendegradasi protein matriks ekstraseluler. Sinar UV dapat memacu sintesis MMP-1 melalui pelepasan Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- α) oleh keratinosit dan fibroblast serta menyebabkan penurunan Transforming Growth Factor-beta

(TGF- β), (Gilchrest, 2007). Pada kulit manusia, MMP-1 adalah tipe yang paling terpengaruh oleh induksi sinar UV matahari dan bertanggung jawab terhadap pemecahan kolagen pada kulit yang mengalami photoaging (Fisher et al., 2001). MMP-1 adalah mediator utama terhadap timbulnya degradasi kolagen pada kulit yang mengalami photoaging. MMP-1 kolagenolitik mendegradasi fibril kolagen dan elastin, yang penting untuk kekuatan dan elastisitas kulit. Aktivitas MMP-1 di kulit akan meningkat walaupun hanya dengan radiasi UV yang singkat sehingga menyebabkan timbulnya kerutan pada kulit dan menjadi tanda photoaging (Yaar and Gilchrest 2008). Berdasarkan alasan diatas maka hambatan terhadap MMP-1 adalah salah satu cara untuk mencegah kerusakan kulit akibat paparan sinar UV.

Penggunaan antioksidan merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk melindungi kulit dari kerusakan akibat radiasi UV (Lin et al.,2003). Obat herbal yang mempunyai aktivitas antioksidan telah diteliti sebagai tabir surya dan anti penuaan kulit diantaranya biji anggur (Mantena,2006), ekstrak teh hijau (Yusuf, 2007; Baumann & Allemann, 2009), tomat (Fazekas et al, 2003), berberin (Kim & Chung,2007), kedelai (Park,2013), coklat (A.Adriani, 2014). Penambahan senyawa antioksidan ke dalam sediaan tabir surya diketahui dapat lebih memberikan efek perlindungan kulit. Senyawa antioksidan dapat meredam efek oksidatif dari reactive oxygen species (ROS) yang muncul akibat radiasi sinar UV (Hassan et al, 2013; Hanson et al, 2011).

Untuk mencegah kerusakan selular yang berhubungan dengan stress oksidatif maka penting untuk menjaga keseimbangan antioksidan dan oksidan dengan suplementasi antioksidan (Hanggono, 2004). Salah satu tanaman Indonesia yang bisa dimanfaatkan untuk tujuan tersebut adalah buah manggis (*Garcinia mangostana*), terutama pemanfaatan kulit buahnya. Tanaman manggis berasal dari hutan tropis di kawasan Asia Tenggara, salah satunya Indonesia. Sudah lama masyarakat tradisional kita mempercayai dan menggunakan kulit manggis sebagai masker untuk mencerahkan, melembabkan dan mengencangkan kulit. Kulit manggis mengeksudasikan resin kuning yang kaya akan *xanton* (Akao *et al.*, 2008). *Mangostin* adalah unsur *xanton* utama, dan terdapat pada tanaman manggis mengekstraksi kulit manggis menemukan kandungan 95% *xanton*, disamping itu didapat juga kandungan *isoflavan*, *tannin* dan *flavonoid* (Priya *et al.*, 2010). Penelitian N.Khairi 2019, krim ekstrak *S.populifolia* mampu menurunkan ekspresi MMP-1 secara bermakna pada kulit mencit yang dipapar UVB dibandingkan krim basis dan kontrol, dari penelitian ini juga didapatkan tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA MMP-1 antara pemeriksaan menggunakan serum darah dan biopsi kulit. Pada penelitian ini pengukuran kadar 8-OHDG, CPD, ekspresi MMP-1 menggunakan serum.

Berdasarkan paparan diatas, perlu dilakukan penelitian untuk menilai efektifitas dari ekstrak kulit buah manggis sebagai antioksidan terhadap hewan coba yang dipaparkan UVB terhadap kadar 8-OHDG, CPD, ekspresi MMP-1, ketebalan dan kepadatan kolagen.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas dapat dirumuskan masalah penelitian untuk membuktikan efek fotoprotektif krim ekstrak kulit buah manggis terhadap 8-OHdG, CPD, dan MMP-1 setelah paparan sinar UVB. Pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah aplikasi krim ekstrak kulit manggis pada mencit mempengaruhi 8-OHdG setelah paparan sinar UVB?
2. Apakah aplikasi krim ekstrak kulit manggis pada mencit mempengaruhi CPD setelah paparan sinar UVB ?
3. Apakah aplikasi krim ekstrak kulit manggis pada mencit mempengaruhi ekspresi MMP-1 setelah paparan sinar UVB?
4. Apakah peningkatan dosis krim ekstrak kulit manggis akan meningkatkan efek fotoprotektif ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aplikasi krim ekstrak kulit manggis terhadap kadar 8-OHdG, CPD dan MMP-1 pada kulit mencit setelah paparan sinar UVB.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membandingkan kadar 8-OHdG pada mencit yang disinari UVB dan diaplikasikan krim ekstrak kulit manggis

- b. Membandingkan kadar CPD pada mencit yang disinari UVB dan diaplikasikan krim ekstrak kulit manggis
- c. Membandingkan ekspresi kadar MMP-1 pada mencit yang disinari UVB dan diaplikasikan krim ekstrak kulit manggis dan paparan UVB
- d. Membandingkan ketebalan dan kepadatan kolagen pada mencit yang dioles krim ekstrak kulit buah manggis pada tiap kelompok mencit

1.4. Hipotesis Penelitian

1. Kadar 8-OHdG, CPD dan ekspresi MMP-1 pada kelompok mencit yang dioleskan krim ekstrak kulit manggis dan dipapari UVB lebih rendah dari pada kelompok mencit dengan paparan UVB
2. Peningkatan dosis krim ekstrak kulit manggis akan menurunkan ekspresi 8-OHdG, CPD dan MMP-1
3. Peningkatan dosis krim ekstrak kulit manggis akan meningkatkan efek protektif.
4. Ketebalan dan kepadatan kolagen pada mencit yang dioles krim ekstrak kulit buah manggis lebih tinggi dibandingkan kelompok kulit mencit yang dipapar UVB.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan pemahaman mekanisme pengaruh krim ekstrak kulit manggis terhadap paparan UVB pada mencit
2. Ekstrak kulit manggis mempunyai efek protektif terhadap paparan UVB dan merupakan sebagai salah satu pilihan agen fotoprotektif alamiah.

3. Sebagai bahan informasi bagi penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Sinar Matahari dan Ultraviolet

Sinar matahari merupakan energi elektromagnetik yang dipancarkan dari permukaan matahari sebagai hasil aktifitas termonuklir dan dipancarkan dalam bentuk gelombang yang terdiri atas sinar kosmik, sinar gamma, sinar-X, sinar UV, sinar kasat mata, sinar infra merah dan gelombang radio (Walker, et al., 2012). Paparan sinar matahari memberikan berbagai efek terhadap manusia. Spektrum sinar matahari yang penting dalam klinik maupun fotobiologi terdiri atas sinar UV dengan panjang gelombang 290-400 nm, sinar kasat mata dengan panjang gelombang 400-760 nm dan sinar infra merah dengan panjang gelombang 760-1800 nm. Sinar UV terbagi menjadi 3 berdasarkan panjang gelombangnya yaitu UVC (100-280/290 nm), UVB (280-315/290-320nm), dan UVA (315-400 nm/320-400 nm) yang terbagi lagi menjadi UVA I (340-400 nm) dan UVA II (315/320-340 nm) (Epstein, 1997). Sinar UVC akan diabsorpsi oleh lapisan ozon, sedangkan sinar UVB dan UVA akan mencapai bumi. Spektrum radiasi sinar UV yang mencapai bumi tersebut tergantung pada letak pada garis lintang, waktu dari hari dan musim, dimana sekitar 1-5% berasal dari radiasi UVB dan 95-99% dari radiasi UVA. Ultraviolet B (290-320 nm) umumnya menimbulkan eritema pada kulit dan kerusakan langsung pada DNA melalui pembentukan dimer pirimidin yakni: CPD dan *pirimidin (6-4) pyrimidone photoproduct*, sedangkan UVA (320-400

nm) dikaitkan dengan efek *tanning* dan *photoaging*. UVA juga menghasilkan ROS yang secara tidak langsung merusak DNA. Kedua radiasi sinar UV tersebut baik UVB maupun UVA dapat mempengaruhi biomolekul kulit (Walker, et al., 2012).

Sinar UVC tidak mencapai permukaan bumi, tetapi penelitian menunjukkan bahwa UVC dapat diabsorpsi hingga lapisan epidermis, sedang UVB dan UVA, yang mempunyai gelombang lebih panjang dapat menembus sampai lapisan dermis (Kochevar, 1993).

II.2. Dampak Sinar Ultraviolet

Ultraviolet B (UVB) merupakan spektrum radiasi ultraviolet dengan panjang gelombang 290 – 320 nm, dan merupakan sinar ultraviolet yang paling efektif menembus bumi dan mengakibatkan kerusakan pada kulit manusia. Kerusakan yang terjadi oleh karena ultraviolet B adalah lebih pada kerusakan DNA sel yang merupakan kromofornya. Sinar UVB banyak terserap ke epidermis dan menembus ke papila dermis. Gejala kerusakan yang terjadi akibat penyerapan UVB ke epidermis berupa eritema. Panjang gelombang dari ultraviolet yang paling efektif menyebabkan eritema yaitu 250-290 nm dan semakin berkurang efek eritemanya seiring dengan bertambahnya panjang gelombang. Pada paparan sinar UVB tunggal dengan dosis suberitema, gejala eritema berangsur berkurang dalam waktu 24 jam. Pada paparan berulang akan terjadi efek kumulatif dan terjadilah eritema. Gejala eritema setelah paparan sinar UVB akan terjadi kemudian dalam waktu tiga-lima jam dan maksimal pada 12-24 jam kemudian, dan berkurang dalam 72 jam. Sebelum

terjadi eritema maka akan terjadi vasodilatasi pembuluh darah. Secara histopatologis pada studi dengan potongan kulit 1- μm yang disinari UVB tunggal dengan dosis tiga MED terjadi kerusakan sel keratinosit pada 30 menit setelah paparan, dan paling jelas pada 24 jam kemudian. Setelah 72 jam sel keratinosit yang rusak berubah menjadi parakeratolitik dan pembesaran sel endotel terjadi setelah 30 menit sampai maksimal 24 jam setelahnya (Gilchrest, 2004).

II.2.1 Efek akut ultraviolet

II.2.1.1 Eritema

Eritema (*sunburn*) merupakan reaksi inflamasi akut pada kulit berkaitan dengan kemerahan yang timbul akibat setelah paparan yang berlebihan radiasi sinar ultraviolet. Eritema yang terbentuk tergantung pada panjang gelombang. UVA yang memiliki dua kategori oleh karena memiliki perbedaan eritemogenik di mana UVA-2 lebih meningkatkan eritema dibandingkan UVA-1. Efektivitas eritema menurun dengan bertambahnya panjang gelombang. Eritema yang diinduksi oleh UVB berespon lebih lambat, mencapai puncaknya setelah enam sampai 24 jam tergantung dosis. Intensitas kemerahan sangat tergantung dosis. Eritema ini dapat bertahan satu hari atau lebih, tergantung dosis dan tipe kulit. Meskipun reaksi akhirnya adalah peningkatan kemerahan kulit, lamanya dan dosis yang mengakibatkan eritema akibat UVB dan UVA sangat berbeda, radiasi UVA sangat kurang efektif mengakibatkan kemerahan dibandingkan dengan UVB. Dosis terendah yang mengakibatkan kemerahan

minimal yang dapat dilihat dengan jelas 24 jam setelah radiasi disebut *minimal erythema dose* (MED). Nilai MED ini bervariasi antara satu orang dengan lainnya tergantung fototipe kulit, warna kulit, dan lokasi anatomi (Rigel *et al.*, 2004).

II.2.1.2 Pigmentasi

Respon pigmentasi kulit mengikuti paparan sinar matahari terdiri dari reaksi kecoklatan (*tanning*) dan pembentukan melanin baru. Respon kecoklatan pada kulit tergantung panjang gelombang radiasi. Eritema yang diinduksi UVB diikuti dengan pigmentasi. Melanisasi yang terjadi akibat paparan kumulatif UVA bertahan lebih lama dibandingkan dengan yang terjadi akibat paparan UVB. Perbedaan ini kemungkinan terjadi akibat lokalisasi pigmen yang diinduksi oleh UVA lebih basal. Melanisasi yang diinduksi oleh UVB menghilang dengan *turn-over* epidermis dalam satu bulan (Fisher *et al.*, 2001; Rigel *et al.*, 2004). Jadi pigmentasi dapat terjadi karena meningkatnya fungsi melanosit, meningkatnya sintesis melanin dan meningkatnya transfer melanosom ke keratinosit.

II.2.1.3 Kerusakan DNA

DNA seluler secara langsung menyerap UVB, dan penyerapan ini menyebabkan lesi pada basa pirimidin, yang menjadi ikatan kovalen dan merusak *heliks* DNA. Apabila kerusakan DNA ini tidak diperbaiki maka akan mengakibatkan kesalahan pembacaan kode genetik, mutasi, dan kematian

sel. Radiasi UVA juga merusak DNA tetapi kurang jika dibandingkan dengan UVB (Rigel *et al.*, 2004; Placzek *et al.*, 2005; Gilchrest dan Krutmann, 2006).

II.2.1.4. Penekanan sistem imun

Paparan sinar ultraviolet ternyata dapat menekan sistem imunitas. Fenomena ini disebut *photo immunosuppression*. Fenomena ini berperan penting terhadap terjadinya kanker kulit, meningkatnya insiden penyakit infeksi dan virus, serta menurunnya efektivitas vaksin. Suatu penelitian menunjukkan bahwa dosis tunggal suberitemal dari radiasi simulator sinar matahari (0,25 atau 0,5 MED) menekan induksi dari respon hipersensitifitas kontak terhadap *dinitroklorobenzena* hingga 50-80% (Rigel *et al.*, 2004).

II.2.2. Efek Kronis Ultraviolet

II.2.2.1 Photoaging

Beberapa perubahan molekuler dan seluler yang diinduksi oleh paparan tunggal radiasi ultraviolet tidak memiliki relevansi dengan kerusakan kronis. Perubahan seluler dan jaringan yang terlibat pada beberapa efek akibat paparan ultraviolet, tidak sesederhana yang terjadi sebagai respon akut. Kromofor terbesar menyerap UVB adalah asam nukleat dan protein, kromofor lainnya menyerap UVA tetapi pada konsentrasi yang rendah (Gichrest, 2004). Kulit yang mengalami *photoaging* secara klinis menunjukkan

karakteristik kasar, kerutan halus dan kasar, hiperpigmentasi yang tidak merata dapat berupa lentigen atau bercak (*freckles*), kelemahan, bengkak, dan telangiectasis (Rigel *et al.*, 2004)

II.2.2.2 Fotokarsinogenesis

Telah banyak penelitian yang menyokong peranan langsung paparan sinar matahari terhadap perkembangan kanker kulit, khususnya kanker kulit non melanoma, seperti melanoma sel skuamosa dan karsinoma sel basal. Sangat sulit mengevaluasi efek paparan ultraviolet pada induksi dan progresi kanker kulit pada manusia. Perkembangan lesi ini membutuhkan waktu bertahun-tahun, dan frekuensi maupun intensitas paparan menyerupai keadaan yang sebenarnya di alam sangatlah sulit (Rigel *et al.*, 2004). Dikatakan juga kerusakan DNA yang disebabkan oleh radiasi UV merupakan penyebab utama perkembangan kanker kulit (Pleczek *et al.*, 2005).

II.3. Efek sinar UV pada matriks ekstraseluler dermis

Radiasi UV memiliki banyak efek negatif terhadap kulit, baik secara langsung maupun tidak langsung. Diperkirakan bahwa sekitar 50% kerusakan yang disebabkan oleh UV terjadi karena pembentukan radikal bebas, sedangkan kerusakan seluler langsung dan mekanisme lainnya merupakan penyebab untuk sisanya. Kerusakan matriks ekstraseluler kulit dermis akibat sinar UV pada dasarnya diperantarai mekanisme seluler dan molekuler antara lain melibatkan reseptor permukaan sel, jalur transduksi sinyal protein *kinase*, faktor transkripsi, matriks metalloproteinase (MMP) (Rabe *et al.*, 2006).

Radiasi UV dapat mengaktivasi reseptor sitokin faktor pertumbuhan (*growth factor*), pada permukaan keratinosit di epidermis dan sel fibroblast pada dermis. Diperkirakan sekitar 15 menit setelah paparan UV, akan terjadi aktivasi reseptor untuk epidermal *growth factor* (IL-1 dan TNF- α) pada keratinosit dan fibroblast. Aktivasi reseptor ini akan menginduksi sinyal intraseluler seperti *MAP kinase* yang selanjutnya mengaktivasi kompleks faktor transkripsi nukleus *activator protein-satu* (AP-1) (Rigel *et al.*, 2004).

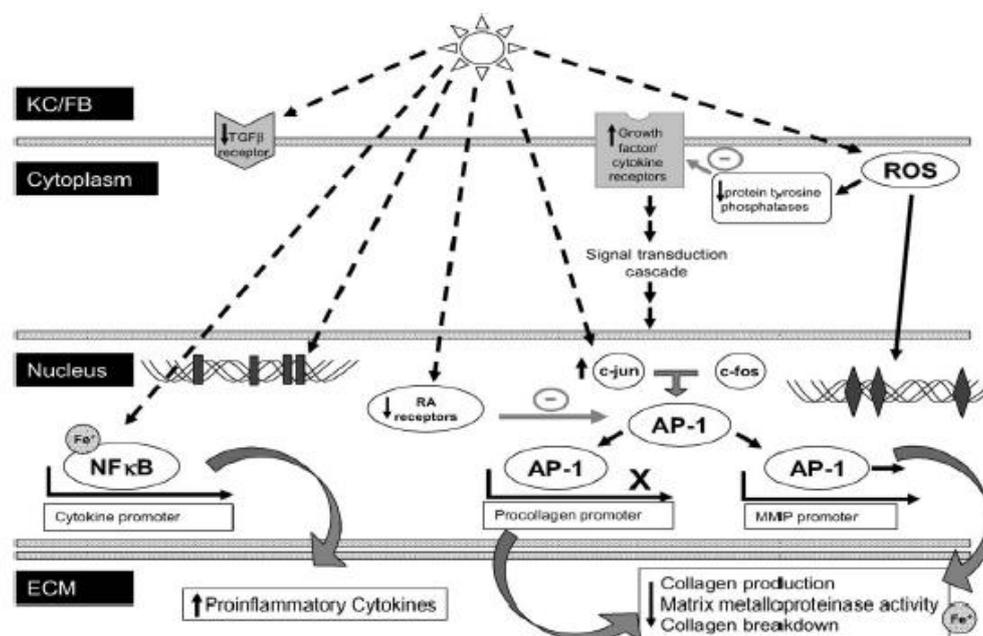
Bukti yang ada terus bertambah dari penelitian *in vitro* bahwa radiasi UV memicu aksi ligand reseptor melalui pembentukan ROS. Telah didahliikan bahwa ROS bersifat sebagai oksidan dan melalui proses oksidasi tersebut akan menurunkan enzim *protein-tyrosine phosphatase*. Penurunan enzim ini akan menyebabkan terjadi *up-regulation* reseptor *growth factor* dan pada akhirnya akan mengaktivasi AP-satu (Rabe *et al.*, 2006). *Reactive oxygen species* (ROS) juga berpengaruh dalam transduksi sinyal yang diperantarai oleh *MAP kinase* (MAPKs), p38 dan *JNK*. Enzim ini sama baiknya dengan *seramid* dari membran sel yang selanjutnya menyebabkan induksi AP-1. *Activator protein-1* terdiri dari dua subunit, yaitu *c-fos* yang diekspresikan secara konstitutif dan *c-jun* yang dapat terinduksi UV. Ekspresi komponen *c-Jun* dari AP-1 yang berlebihan pada fibroblast hasil kultur dapat mengurangi jumlah ekspresi kolagen-1. Pada dermis dan epidermis, AP-1 menginduksi ekspresi *MMP kolagenase* (MMP-1), *stromelysin-1* (MMP-3) dan *gelatinase 92-kd* (MMP-9) yang merusak kolagen dan protein lain yang menyusun matriks ekstraseluler dermis. AP-1 dapat menekan ekspresi gen prokolagen-1,

prokolagen-3 dan TGF β sel fibroblas dermis sehingga terjadi penurunan sintesis kolagen. Pada manusia dalam waktu beberapa jam terpapar sinar UV akan terbentuk MMPs khususnya *gelatinase* dan *kolegenase* yang pada akhirnya menurunkan jumlah kolagen pada lapisan dermis (Fisher *et al.*, 2002; Rhein dan Santiago, 2010).

Up-regulation MMPs dapat terjadi walau hanya menerima dosis minimum UV yang besarnya jauh di bawah dosis yang diperlukan untuk menyebabkan terjadinya eritema serta didapat hubungan dosis antara paparan UV dan induksi MMPs. Paparan terhadap sinar UV dalam jumlah yang tidak cukup untuk menyebabkan terbakarnya kulit (*sunburn*) dapat memfasilitasi terjadinya degradasi kolagen kulit yang menyebabkan terjadi *photoaging*. Paparan dosis sangat rendah berulang sinar UV pada dosis yang setara dengan lima sampai dengan 15 menit paparan terhadap matahari siang setiap dua hari sekali adalah cukup untuk mempertahankan tingkat MMP yang meningkat ini (Cunningham *et al.*, 2005).

Faktor *transkripsi Nuclear Factor-kB* (NF- κ B) juga diaktivasi oleh sinar UV melalui mekanisme *iron-dependent*. Mekanisme ini memperkuat respon UV dengan menstimulasi transkripsi sitokin untuk proses inflamasi dan menarik neutrofil yang mengandung *neutrophil collagenase* (MMP-1) yang telah terbentuk sebelumnya (Fisher *et al.*, 2007). *Nuclear Factor-kB* (NF- κ B) juga dapat meningkatkan ekspresi MMP-9 (Kim *et al.*, 2007; Rhein dan Santiago, 2010).

Produksi kolagen berkurang pada kulit yang mengalami *photoaging*. Setelah radiasi UV, persediaan prokolagen tampak jelas berkurang dan tidak ada sama sekali saat 24 jam setelah paparan *in vivo*. AP-1 dan *transforming growth factor β* (TGF- β) terlibat dalam *down-regulation* sintesis kolagen yang dimediasi oleh UV ini (Chung *et al.*, 2004; Rabe *et al.*, 2006).



Gambar -1. Efek radiasi UV pada keratinosit (KC) dan fibroblas (F). Radiasi UV memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat merusak DNA dan menghambat kerja enzim *tirosin fosfatase*. UV juga dapat menurunkan reseptor asam retinoat (RA) dan memicu peningkatan *nuclear factor-kB* (NFk), dengan efek akhir penurunan produksi kolagen, pemecahan kolagen, akibat aktivitas matriks metaloproteinase (MMP).
(Sumber: Rigel *et al.*, 2004; Rabe *et al.*, 2006)

Secara keseluruhan, efek radiasi UV pada dermis menghasilkan degradasi kolagen, hambatan sintesis kolagen, inflamasi dan stress oksidatif, serta penurunan kemampuan sel dan pada akhirnya terjadi proses *apoptosis* (Cunningham *et al.*, 2005; Rabe *et al.*, 2006).

II.4. Radikal Bebas

II.4.1 Definisi

Radikal bebas adalah molekul oksigen yang tidak stabil atau molekul lainnya yang tidak stabil. Molekul-molekul tersebut hanya mengandung satu atau lebih elektron bebas (elektron yang tidak berpasangan = *unpaired electrons*). Adanya satu atau lebih elektron bebas menyebabkan senyawa itu menjadi sangat reaktif. Molekul tersebut akan berusaha secara reaktif mencari pasangan elektron dengan mengambil atau mencuri dari elektron sel lainnya, sel yang diambil elektronnya akan menjadi molekul reaktif juga, demikian seterusnya secara berantai, sehingga sering disebut ROS (Bauman, 2002; Chen *et al.* 2012).

II.4.2 Jenis dan sumber radikal bebas

Terbentuknya radikal bebas dapat terjadi melalui sistem internal yang melibatkan sistem biologis tubuh maupun pengaruh eksternal seperti faktor lingkungan. Reaksi inflamasi ataupun setiap respirasi di mitokondria dapat menghasilkan oksidan. Kelebihan gizi juga dapat menimbulkan radikal bebas. Pada saat terjadi proses metabolisme lemak di samping terbentuk energi ternyata dapat menimbulkan oksidan. Faktor lingkungan antara lain seperti

paparan sinar UV, polusi asap rokok atau pabrik, emisi kendaraan bermotor, konsumsi alkohol akan dapat menyebabkan terbentuk radikal bebas (Pinnel, 2003; Ardhie, 2011).

Oksigen penting untuk kehidupan organisme aerob, akan tetapi oksigen dapat mengalami reduksi parsial menjadi radikal bebas seperti *anion superoksida*, *hidrogen peroksida* pada saat metabolisme normal di mitokondria dan di *peroxisomes*. Radikal bebas dapat terbentuk akibat aktivitas dalam berbagai sistem enzim seperti *sitokrom p-450*, enzim yang berhubungan dengan oksidasi pada plasma membran seperti *lipoksigenase* dan *xanthine oxidase*. *Hidrogen peroksida* merupakan oksidan yang lemah dibanding *anion superoksida*, berfungsi sebagai intermediasi dalam produksi metabolisme oksigen yang reaktif dan toksik seperti *hypochlorous acid* yang terbentuk dari aktifitas *mieloperoksidase* dan radikal *hidroksil*, serta melalui oksidasi metal transisi (Moini *et al.*, 2002; Pinnel, 2003; Chen, 2012).

Sebagian hasil reduksi metabolik oksigen yang dikenal dengan istilah ROS, ternyata reaktifitasnya relatif lebih tinggi dibanding oksigen. *Nitrit oksida* (NO) yang diproduksi berlebihan juga merupakan sumber oksidan toksik yang dikenal dengan istilah RNOS, seperti *peroxynitrite*, *nitroxyl*, *oxide nitrogen*. *Oxide nitrogen* merupakan reaksi dari NO dengan *anion superoksida* atau molekul oksigen (Moini *et al.*, 2002).

Fungsi utama ROS atau RNOS adalah untuk mekanisme pertahanan imunologis, yang akan mengalami degenerasi dibantu oleh makrofag dan netrofil untuk mengeliminasi mikroba dan benda asing. Fakta terakhir

menunjukkan bahwa NO penting dalam neurotransmisi dan mengatur tekanan darah. Fakta lain, sel non fagosit beberapa sitokin, *growth factor*, hormon dan neurotransmitter produksi meningkat akibat pacuan ROS dan atau RNOS yang berperan dalam signal molekul atau sebagai transduksi signal (Moini *et al.*, 2002).

Akan tetapi ROS atau RNOS level tinggi cenderung menyebabkan kerusakan makromolekul seluler seperti lemak, protein dan DNA. Efek merusak radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem pertahanan antioksidan, seperti sistem enzim endogen yang menetralkan radikal bebas seperti *superoksid dismutase*, *katalase*, *glutation peroksidase* dan antioksidan non enzim dengan berat molekul rendah seperti *glutathione* (GSH) dan *thioridoksin* (Moini *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2012).

Apabila terjadi pembentukan radikal bebas melebihi antioksidan dalam tubuh ataupun antioksidan dari konsumsi makanan akan menyebabkan kerusakan secara berantai sampai ke tingkat seluler dikenal dengan istilah stres oksidatif. Jadi stres oksidatif didefinisikan secara luas sebagai ketidakseimbangan antara kapasitas produksi oksidan dan antioksidan yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel. Walaupun beberapa reaksi sistem biologis berperan dalam menjaga keseimbangan konsentrasi *anion superoksida* dan *hidrogen peroksida* akan tetapi mitokondria rupanya menjadi sumber yang paling penting untuk terbentuk radikal bebas. Produk berlebihan ROS dan RNOS berperan dalam patogenesis dan perkembangan penyakit

peradangan kronis, aterosklerosis, kanker, diabetes dan proses *aging* (Moini *et al.*, 2002; Pinnel, 2003).

ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sampai ke tingkat seluler oleh karena pengambilan elektron baik dari komponen lemak, protein, DNA termasuk kerusakan pada sel yang berhubungan dengan proses penuaan. Diperkirakan setiap hari terjadi kerusakan sebanyak 10.000 DNA akibat proses oksidatif dalam tubuh yang menimbulkan radikal bebas. Oksigen yang kita hirup digunakan dalam metabolisme tubuh, sebanyak 95% mengalami metabolisme lengkap, 5% menghasilkan ROS (*semi Reduce oxygen species*) (Moini *et al.*, 2002; Pinnel, 2003; Ardhie, 2011).

Berbagai jenis radikal bebas yang ada dalam tubuh dapat dibedakan menjadi dua bagian besar. Pertama adalah molekul oksigen dengan elektron yang tidak berpasangan di antaranya adalah *anion superoksida* ($+O_2^-$), *radikal hidroksil* (OH^-), *radikal peroksil lipid* (LOO) sedangkan yang kedua adalah molekul oksigen tunggal (Bauman, 2002; Ardhie, 2011).

Anion superoksida merupakan radikal bebas yang pertama kali terbentuk saat metabolisme *lipid* maupun protein. Segera setelah terbentuk radikal ini melalui sistem enzim akan diubah menjadi *hidrogen peroksida* (H_2O_2). *Hidrogen peroksida* merupakan oksidan lemah dan mampu menginisiasi proses oksidatif sehingga dapat membentuk radikal bebas. Perubahan H_2O_2 menjadi OH^- melalui reaksi yang dikatalasi oleh transisi metal (Fe^{2+} atau Cu^{2+}) (Moini, 2002; Pinnel, 2003).

Ada beberapa mekanisme yang menyebabkan sinar UV menimbulkan kerusakan pada kulit. Sinar UVB memicu produksi *anion superoksida* melalui aktivasi *NADPH oksidase* dan rantai reaksi pernafasan di mitokondria. Sinar UVB yang diserap DNA dapat juga menyebabkan kerusakan langsung pada DNA. Sedangkan UVA melalui reaksi fotokimia diserap kromofor seperti riboflavin atau porpirin dan menimbulkan radikal bebas. Biasanya UVA memicu terbentuk ROS berupa molekul oksigen tunggal, sedangkan UVB memicu radikal *hidroksil* dan *lipid peroksidase* (Masaki, 2010).

II.4.3. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) merupakan salah satu oksidatif utama dari produk dasar modifikasi DNA yang pertama kali dilaporkan oleh Kasai et al yang dibentuk oleh interaksi antara *hydroxyl free-radical* (OH) dan aksi fotodinamik oksigen tunggal dengan DNA. 8-OHdG merupakan lesi akibat kerusakan oksidatif DNA yang mutagenik pada sel mamalia. Beberapa penelitian melaporkan kadar 8-OHdG yang tinggi pada jaringan kanker manusia dan tumor pada hewan coba dibandingkan jaringan normal (Kumar.,2012, Klaunig.,2010). 8 OHdG merupakan biomarker kerusakan oksidatif DNA dan pengukuran kadar 8-OHdG digunakan sebagai evaluasi terhadap stress oksidatif dan penilaian 8-OHdG pada berbagai material biologi seperti serum dan urin, merupakan hal yang penting untuk mengetahui peran stress oksidatif dalam menyebabkan perkembangan kanker dan intervensi penyakit. Pengukuran yang akurat dan terpercaya terhadap kerusakan oksidatif pada DNA adalah sangat penting pada evaluasi tingkat

atau luas dan distribusi dari ROS yang menginduksi kerusakan dalam proses suatu penyakit. (Klauning., 2010). Pengukuran kadar 8-OHdG memiliki sensitivitas yang sangat tinggi dan dihubungkan dengan stress oksidatif dan kanker pada jaringan target. Oleh sebab itu, 8-OHdG merupakan tanda yang paling sering digunakan untuk menilai kerusakan oksidatif DNA (Can.,2010).

II.4.4. Cyclobutamin Pyrimidine Dimers (CPD)

DNA merupakan kromofor endogen yang paling penting karena menyerap UVB dan Sebagian UVA yang menghasilkan fotoproduk *Cyclobutamin Pyrimidine Dimers* (CPD) dan 6,4 PP (*pyrimidine 6-4*). CPD merupakan jenis foto produk yang paling umum dan paling merusak, dimana jumlahnya mencapai 75 % dan sisanya berupa 6,4 PP (Patrick, 1977). Tingkat eliminasi CPD jauh lebih lambat daripada 6,4 PP, sehingga dimer timin ini diduga bersifat lebih mutagenic. Peningkatan kadar CPD dan atau penurunan tingkat eliminasi secara statistic terkait dengan kerentanan mutase dan perkembangan kanker kulit (Kraemer et al.,1994).

Terbentuknya fotoproduk mengakibatkan kerusakan struktural pada heliks DNA yang menghambat replikasi dan transkripsi DNA. Dosis UVB yang relative rendah dan bahkan subterimik telah terbukti menyebabkan kerusakan berbagai DNA pada epidermis (Seite et al., 2010). CPD memprovokasi peradangan yang dimediasi oleh sitokin yang mengakibatkan eritema, imunosupresi dan mutase transisi yang bersamaan yang dapat menyebabkan kanker keratinosit (Younget al.,2017).

II.4.5. Matriks Mettaloproteinase 1 (MMP-1)

MMP adalah enzyme proteinase mengandung zinc, yang bertanggung jawab mendegradasi protein matriks ekstraseluler. Sinar UV dapat memacu sintesis MMP-1 melalui pelepasan Tumor Necrosing Factor-alfa (TNF- α) oleh keratinosit dan fibroblast serta menyebabkan penurunan Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), (Gilchrest, 2007). Pada kulit manusia, MMP-1 adalah tipe yang paling terpengaruh oleh induksi sinar UV matahari dan bertanggung jawab terhadap pemecahan kolagen pada kulit yang mengalami photoaging (Fisher et al., 2001). MMP-1 adalah mediator utama terhadap timbulnya degradasi kolagen pada kulit yang mengalami photoaging. MMP-1 kolagenolitik mendegradasi fibril kolagen dan elastin, yang penting untuk kekuatan dan elastisitas kulit. Aktivitas MMP-1 di kulit akan meningkat walaupun hanya dengan radiasi UV yang singkat sehingga menyebabkan timbulnya kerutan pada kulit dan menjadi tanda photoaging (Yaar and Gilchrest 2008). Berdasarkan alasan diatas maka hambatan terhadap MMP-1 adalah salah satu cara untuk mencegah kerusakan kulit akibat paparan sinar UV.

II.4.6 Kolagen

Kolagen merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia (Rhein dan Santiago, 2010).

Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah (Uito *et al.*, 2008).

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas (Uito *et al.*, 2008; Rhein, 2010).

Pada umumnya jumlah kolagen akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe kolagen mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak kolagen-3 (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses penuaan intrinsik akan terjadi penurunan kolagen-3 dan peningkatan kolagen-1. Kolagen-1 terus meningkat

sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu kolagen-1 akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah kolagen sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah kolagen manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda (Rhein dan Santiago, 2010).

Kolagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah kolagen merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan kolagen sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UV dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage* (Uito *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2009).

Walaupun kolagen-1 merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi kolagen tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. Kolagen-7 yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UV kronis akan menurunkan jumlah kolagen-7 dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*.

Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan kolagen-7 pada pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan kolagen-4 pada tempat yang sama (Rhein dan Santiago, 2010).

Krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai (Anonim, 1995). Krim berupa emulsi mengandung air tidak kurang dari 60% dan dimaksudkan untuk pemakaian luar. Ada dua tipe krim, krim tipe minyak dalam air (M/A) dan tipe air dalam minyak (A/M)

II.5. Manggis

Indonesia merupakan negara terbesar kedua di dunia setelah Brazil yang mempunyai biodiversitas (keanekaragaman hayati). Biodiversitas tersebut meliputi : ekosistem, jenis maupun genetik. Termasuk dalam biodiversitas jenis adalah keanekaragaman tanaman di Indonesia yang sangat besar, termasuk tanaman yang berpotensi sebagai obat. Seiring dengan ada slogan "*back to nature*", maupun krisis ekonomi yang berkepanjangan sehingga mengakibatkan daya beli masyarakat terutama masyarakat golongan menengah ke bawah, penggunaan obat tradisional menjadi alternatif pengobatan di samping obat modern. Salah satu tanaman Indonesia yang bisa dimanfaatkan untuk tujuan tersebut adalah buah manggis (*Garcinia mangostana L.*), terutama pemanfaatan kulit buahnya. Manggis juga merupakan salah satu buah favorit yang digemari oleh masyarakat Indonesia. Dari tahun ke tahun permintaan manggis meningkat seiring dengan kebutuhan konsumen terhadap buah manggis (Nugroho, 2011).

II.5.1. Karakteristik manggis

Nama ilmiah manggis adalah *Garcinia mangostana*, diameter buahnya secara keseluruhan 2,4-7,5cm, ketebalan kulit 0,6-1cm dengan pigmen warna ungu (Akao *et al.*, 2008). *Garcinia mangostana* merupakan buah tropis yang dikenal sebagai "*superfruits*" karena karakteristik rasa, bau, penampilan yang berkualitas juga kekayaan nutrisi juga kekuatan antioksidannya (Priya *et al.*, 2010). Kulit buah manggis yang dibuang, ternyata dapat dikembangkan sebagai kandidat obat (Nugroho, 2011). Kulit manggis telah digunakan secara luas sebagai obat tradisional selama bertahun-tahun (Pedraza *et al.*, 2008). Kedudukan tanaman manggis dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :⁽¹⁷⁾

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Subdivisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Ordo : Guttiferales
- Famili : Guttiferae
- Genus : *Garcinia*
- Spesies : *Garcinia mangostana*, *Garcinia morella*, *Garcinia hamburgi*, dsb.



Gambar 2. Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

II.5.2. Klasifikasi dan Identifikasi

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan salah satu buah yang digemari oleh masyarakat Indonesia. Tanaman manggis berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Indonesia. Dari Asia Tenggara, tanaman ini menyebar ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Filipina, Papua New Guinea, Kamboja, Thailand, Srilanka, Madagaskar, Honduras, Brazil dan Australia Utara. Manggis merupakan salah satu buah unggulan Indonesia yang memiliki peluang ekspor cukup menjanjikan.

Permintaan manggis meningkat dari tahun ke tahun seiring dengan kebutuhan konsumen terhadap buah yang mendapat julukan ratu buah (*Queen of Fruits*). Ekspor manggis dari Indonesia mengalami peningkatan

seiring dengan kebutuhan buah manggis dunia terutama Hongkong, Singapura, dan Inggris. Manggis (*Garcinia mangostana* L.) mempunyai berbagai macam nama local khususnya di Indonesia seperti manggu (Jawa Barat), manggus (Lampung), Manggusto (Sulawesi Utara), manggista (Sumatera Barat). Pohon manggis dapat tumbuh di dataran rendah sampai di ketinggian di bawah 1.000 m dpl. Pertumbuhan terbaik dicapai pada daerah dengan ketinggian di bawah 500-600 m dpl. Pusat penanaman pohon manggis adalah Kalimantan Timur, Kalimantan Tengah, Jawa Barat (Jasinga, Ciamis, Wanayasa), Sumatera Barat, Sumatera Utara, Riau, Jawa Timur dan Sulawesi Utara. (18) Buah manggis dapat disajikan dalam bentuk segar, sebagai buah kaleng, dibuat sirop/sari buah. Secara tradisional buah manggis digunakan sebagai obat sariawan, wasir dan luka. Kulit buah dimanfaatkan sebagai pewarna termasuk untuk tekstil dan air rebusannya dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Batang pohon dipakai sebagai bahan bangunan, kayu bakar/ kerajinan.⁽¹⁸⁾

II.5.3. Pemanfaatan Kulit Buah Manggis

Kulit buah manggis yang dahulu hanya dibuang saja ternyata dapat dikembangkan sebagai obat. Kulit buah manggis setelah diteliti ternyata mengandung beberapa senyawa dengan aktivitas farmakologi misalnya anti *inflamasi*, *antihistamin*, pengobatan penyakit jantung, anti bakteri, anti jamur. Beberapa senyawa utama kandungan kulit buah manggis adalah golongan *xanthone*. Senyawa *xanthone* yang telah teridentifikasi, diantaranya *alfa mangostin* dan *gamma-mangostin*.⁽¹⁹⁾

Pemanfaatan kulit buah manggis sebenarnya sudah dilakukan sejak lama. Kulit buah manggis secara tradisional digunakan pada berbagai pengobatan di Negara India, Myanmar, Sri Lanka, dan Thailand. Secara luas, masyarakat Thailand memanfaatkan kulit buah manggis untuk pengobatan penyakit sariawan, *disentri*, *cystitis*, diare, *gonorea*, dan *eksim*.⁽¹⁹⁾

Kulit buah manggis dibuat menjadi salep untuk mengobati *eksim*, air rebusan kulit buah manggis juga digunakan sebagai ramuan untuk mengobati luka, demam, diare, sariawan dan sembelit, selain itu juga bubuk atau serbuk dari kulit buah manggis yang dikeringkan juga bermanfaat untuk mengobati *disentri*. Ekstrak kulit manggis sendiri dapat dikonsumsi hingga 500 mg/hari.

II.5.4. Kandungan

Kulit manggis mengeksudasikan resin kuning yang kaya akan *xanton* (Akao *et al.*, 2008). Priya *et al.*, (2010) mengekstraksi kulit manggis menemukan kandungan 95% *xanton*, disamping itu didapat juga kandungan *isoflavin*, *tannin* dan *flavonoid* (Priya *et al.*, 2010). Selain itu kulit buah manggis juga mengandung *antosianin* (Pradipta *et al.*, 2009). Dan uji fitokimia kulit manggis dengan metode DPPH tgl 7 mei 2013 di fakultas teknologi pertanian unit pelayanan laboratrium uji fitokimia UNUD diketahui kulit manggis memiliki kandungan vitamin C, fenol dan antosianin yang cukup tinggi (Ericson,2014). Jadi kandungan *xanton*, vitamin C, fenol dan antosianin yang ada dalam kulit manggis ini merupakan antioksidan yang mampu mencegah penuaan kulit dini. *Xanton* adalah kelompok pigmen kuning yang terdapat pada beberapa family tanaman tinggi, jamur, tanaman lumut.

Mangostin adalah unsur *xanton* utama, dan terdapat pada tanaman manggis (Peres *et al.*, 2000). *Xanton* telah diisolasi dari buah, kulit, daun dari manggis. Beberapa penelitian menunjukkan *xanton* dari manggis memiliki aktivitas biologis (Suksamrarn *et al.*, 2006).

IPB melakukan evaluasi biomassa, kadar, profil *xanton* dan potensi antioksidan pada beberapa sentra produksi manggis (Kaligesing/Purworejo, Wanayasa/Purwakarta, Puspahiangan/Tasikmalaya, Watulimo/Trenggalek, Leuwiliang/Bogor). Pada sentra produksi manggis di Purworejo didapat bobot kulit dibanding buah 62,84%, derivat *xanton* 18,07%. Derivate *xanton* yang diisolasi pada manggis Kaligesing antara lain *Dehydration 6-O-methylmangostanin*, *3-isomangostin*, *Mangostanol*, *Gartanin*, *Mangoxanthone*, *8-deoxygartanin*, *Mangostenone*, α -*mangostin*, *mangostenone B*, *9-hydroxycalabaxanthone*, β -*mangostin*, *mangostenone B*, *Garciniafuran*. Aktivitas antioksidan sangat kuat sebagai penangkap radikal bebas (*radical scavenging*) (IPB, 2009). Hasil penelitian yang banyak dilaporkan tentang *xanton* lebih banyak pada isolasi, identifikasi struktur dan efikasinya (Chairungsri *et al.*, 2007). Terdapat 50 jenis *xanton* alami yang dilaporkan terdapat pada kulit manggis (Pedreza *et al.*, 2008).

Xanton merupakan senyawa polifenolik dengan struktur kimia yang mengandung cincin trisiklik aromatik. Struktur ini yang memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan, antinflamasi, antibakteri, antikanker (Nakagawa *et al.*, 2007).

II.5.5. Aktivitas biologis

II.5.5.1. Antioksidan

Ekstrak kulit manggis diuji aktivitas antioksidan dengan metode *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH) berdasar parameter nilai *Effective Concentration 50* (EC50) didapat 8,5539ug/ml (< 50ug/ml) berarti aktivitas antioksidan tinggi (Supiyanti *et al.*, 2010). Ekstrak kulit buah manggis berpotensi sebagai antioksidan (Moongkarndi *et al.*, 2004). Penelitian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap beberapa ekstrak kulit buah manggis yaitu ekstrak air, etanol 50% dan 95%, serta *etil asetat*. Metode yang digunakan adalah penangkapan radikal bebas DPPH (Weecharangsan *et al.*, 2006). Pemberian *α-mangostin* menunjukkan efek protektif melawan peroksidasi lipid dan mempertahankan antioksidan (Sampath dan Vijayaraghavan., 2007). Jung *et al.* (2006) mengukur kapasitas penangkal *peroksinitrit* (ONOO₋) dari 13 *xanton* dengan memonitor oksidasi *dihidrorhodamin 123* (DHR-123) . *Xanton* yang memiliki kapasitas penangkal ONOO₋ terbesar adalah *smeathxanthone A*, *8-hydroxycudraxanthone G*, *γ-mangostin*, *gartanin*, *α-mangostin*, *garcinone E*, *garcimangosone B*, *1-isomangostin* dan *garcinone D* (Jung *et al.*, 2006). Peneliti lain menemukan adanya tujuh *xanton* yaitu *3-isomangostin*, *8-desoxygartanin*, *gartanin*, *α-mangostin*, *garcinone E*, *9-hydroxycalabaxanthone* dan *β-mangostin* yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Zarena dan Sankar, 2009).

II.5.5.2. Antikanker

Terdapat laporan bahwa ekstrak metanol kulit buah manggis menunjukkan aktivitas sangat poten dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara SKBR-3, dan menunjukkan aktivitas apoptosis (Moongkarndi *et al.*, 2004). Berdasarkan penelitian tersebut, senyawa *garsinon E* menunjukkan aktivitas sitotoksitas paling poten terhadap sel kanker hati (Ho *et al.*, 2002).

Di lain pihak, terdapat uji serupa yaitu aktivitas antiproliferatif dan apoptosis pada pertumbuhan sel leukemia manusia HL60. α -*mangostin* menunjukkan aktivitas anti-proliferasi dan apoptosis terpoten diantara senyawa *xanton* lainnya (Matsumoto *et al.*, 2003). Nabandith *et al.*, (2004) melakukan penelitian *in vivo* aktivitas kemopreventif α -*mangostin* pada lesi preneoplastik putatif yang terlibat pada karsinogenesis kolon tikus, disimpulkan senyawa tersebut menurunkan terjadinya lesi fokal dan epitelium kolon tikus (Nabandith *et al.*, 2004). Penelitian α -*mangostin* (0,10,20 mg/kgBB/hari) memicu peningkatan supresi pertumbuhan tumor dan metastase lodus limfatik pada model kanker payudara dengan mutasi *p53* (Shibata *et al.*, 2011).

II.5.5.3. Aktivitas anti-histamin

Dalam reaksi alergi, komponen utama yang mengambil peran penting adalah sel mast, beserta mediator-mediator yang dilepaskannya yaitu *histamin* dan *serotonin*. Setelah adanya interaksi kembali antara antigen-antibodi, akan merangsang sel mast untuk melepaskan *histamin* (Kresno, 2001). Berhubungan dengan reaksi alergi atau pelepasan histamin tersebut,

Chairungrilerd *et al.* (2007) melakukan pengujian ekstrak metanol kulit buah manggis terhadap kontraksi aorta dada kelinci terisolasi yang diinduksi oleh histamin maupun *serotonin*. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa α -*mangostin* tersebut dikategorikan sebagai penghambat reseptor histaminergik khususnya H-1, sedangkan γ -*mangostin* sebagai pengeblok reseptor *serotonergik* khususnya *5-hidroksitriptamin 2-A* atau 5-HT-2A (Chairungrilerd, 2007).

II.5.5.4. Anti-inflamasi

Penelitian mengenai aktivitas anti-inflamasi dari kulit buah manggis sampai saat ini baru dilakukan pada tahapan *in vitro*. Dari hasil penelitian diduga bahwa senyawa yang mempunyai aktivitas anti-inflamasi adalah γ -*mangostin*. Nakatani *et al.*, (2002) melakukan penelitian aktivitas anti-inflamasi *in vitro* dari γ -*mangostin* terhadap sintesa PGE-2 dan *siklooksigenase* (COX) dalam sel glioma tikus C-6. γ -*mangostin* menghambat secara poten pelepasan PGE-2. γ -*mangostin* menghambat perubahan asam *arakidonat* menjadi PGE-2 dalam mikrosomal, ini ada kemungkinan penghambatan pada jalur *siklooksigenase*. Pada percobaan enzimatik *in vitro*, senyawa ini mampu menghambat aktivitas enzim COX-1 dan COX-2 (Nakatani *et al.*, 2002).

II.5.5.5 Antibakteri

Selain memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti di atas, kulit buah manggis juga menunjukkan aktivitas antimikroorganisme termasuk *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Salmonella typhimurium*, spesies *Enterococcus*, *Mycobacterium tuberculosis* dan *propionibacterium acnes*. Penelitian fitokimia menunjukkan komponen yang berperan adalah derivat *xanton* seperti α -, β -, γ - *mangostin*, *gartinin*, 1- dan 3- *isomangostin* (Chomnawang *et al.*, 2005). Ekstrak kulit manggis efektif melawan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* dan *Mikrococcus lutus* (Priya *et al.*, 2010). Ekstrak kulit manggis juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *streptococcus mutans* dimana bakteri ini berhubungan dengan pembentukan plak gigi dan caries gigi (Torrungruang, 2007). Suksamrarn *et al.* (2006) bersama kelompoknya asal Thailand, melakukan penelitian potensi antituberkulosa dari senyawa *xanton* terprenilasi yang diisolasi dari kulit buah manggis. Dari beberapa penelitian diantara semua derivat *xanton*, α -*mangostin* memiliki aktivitas antibakteri yang paling poten (Suksamrarn *et al.*, 2006; Chomnawang *et al.*, 2005).

II.6. MENCIT(*Mus musculus*)

Klasifikasi ilmiah pada mencit , yaitu:

- Kerajaan : Animalia
- Filum : Chordata
- Kelas : Mammalia
- Ordo : Rodentia
- Famili : Muridae
- Upafamili : Murinae
- Genus : Mus
- Spesies : *Mus musculus*



Gambar 3. Mencit (*Mus musculus*)

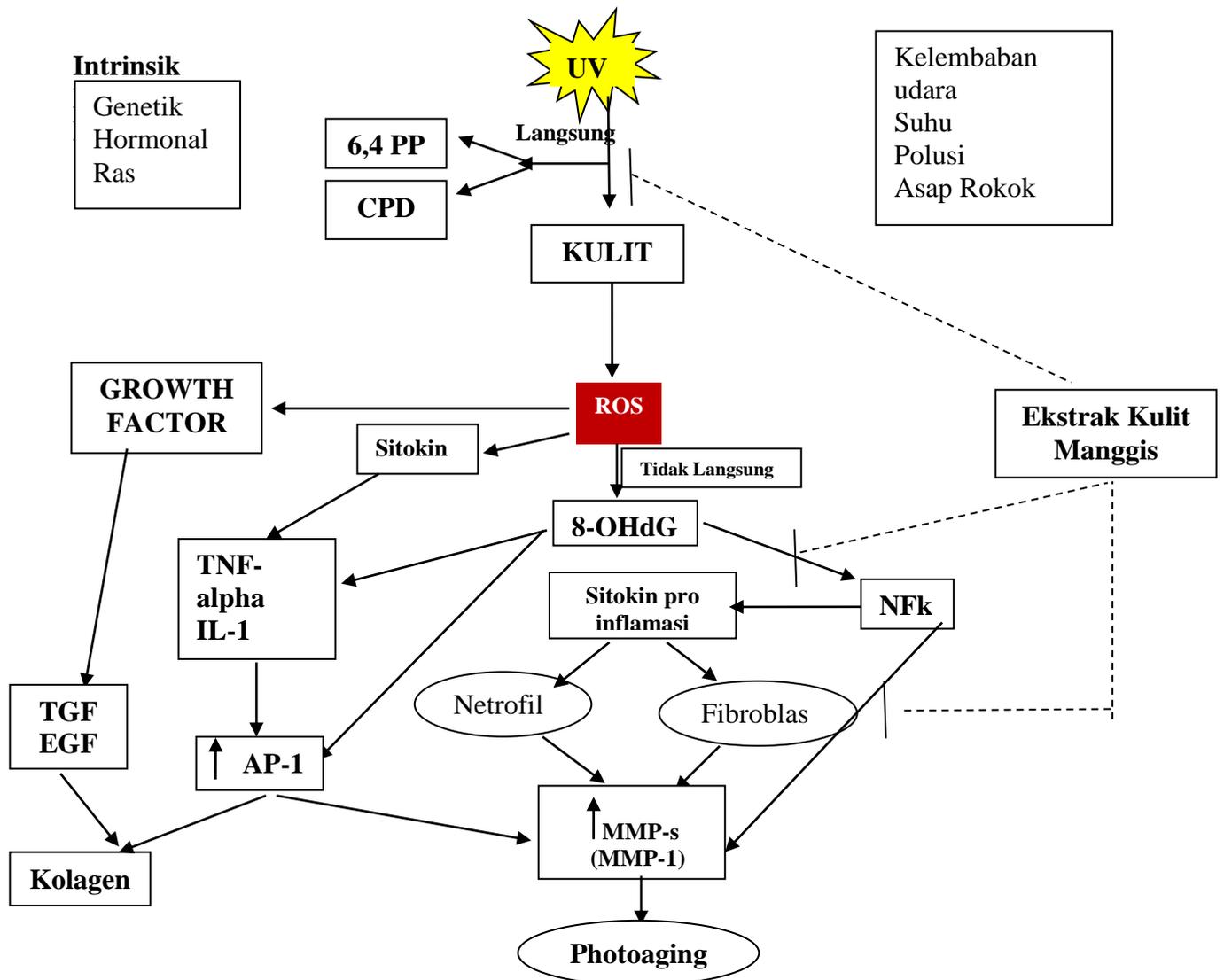
Mencit (*Mus musculus*) adalah anggota Muridae (tikus-tikusan) yang berukuran kecil. Hewan ini diduga sebagai mamalia terbanyak kedua di dunia, setelah manusia. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar di hutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal di perkotaan. Mencit merupakan hewan yang jinak, lemah, mudah ditangani, takut cahaya dan aktif pada malam hari. (Marshall dan Huges., 2013)

Ciri khas dari mencit yaitu kulit, rambut tidak berpigmen sehingga warnanya putih, mencit lebih tahan lama terhadap penyakit dan lebih jinak. Semua hewan termasuk mencit dapat tumbuh lebih cepat pada waktu masih muda, sejak terjadinya pembuahan, sampai lahir dan sampai mendekati dewasa tubuh, kecepatan pertumbuhan semakin berkurang dengan bertambahnya umur dan akhirnya pertumbuhan terhenti. (Marshall dan Huges., 2013).

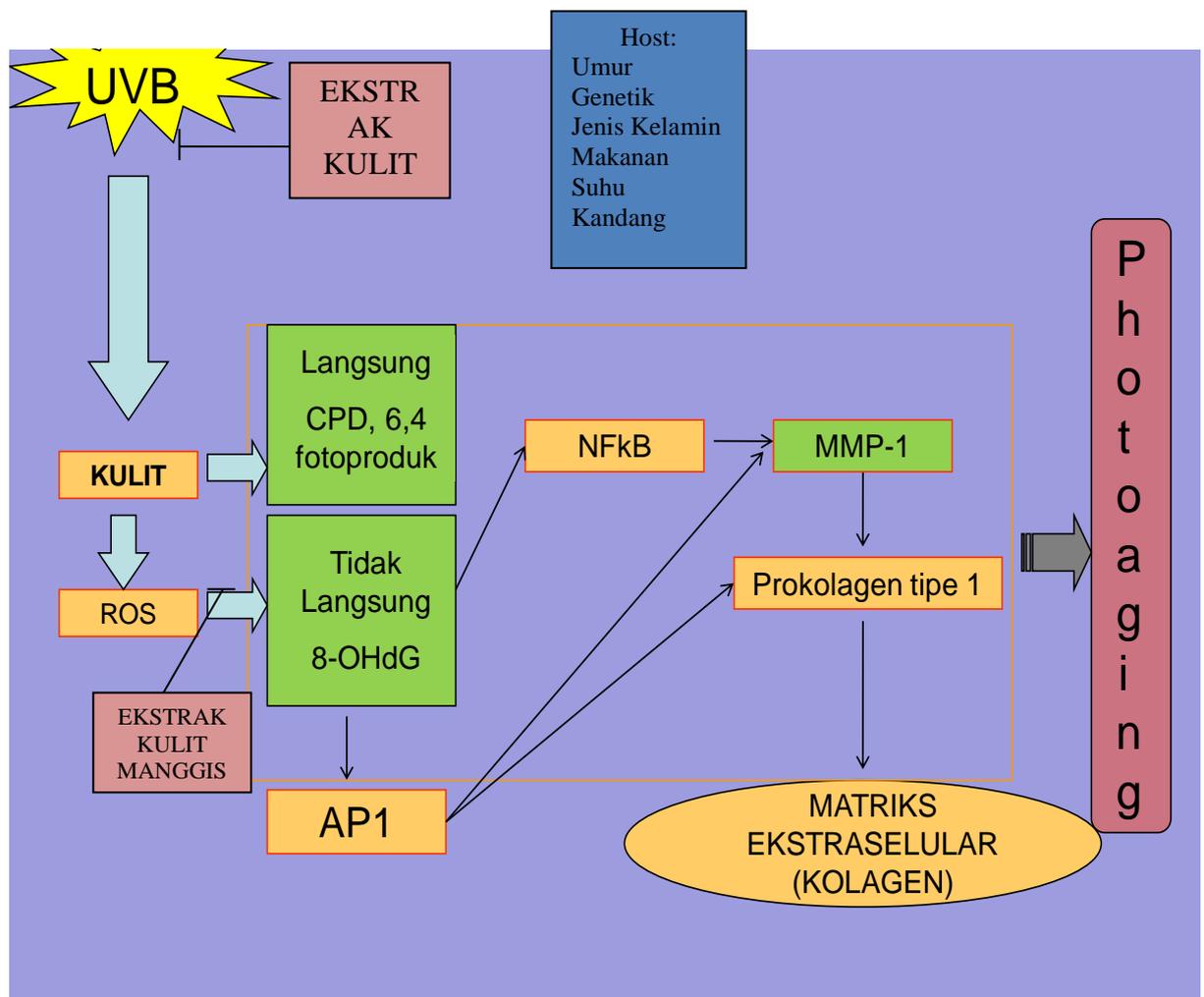
Mencit sering digunakan sebagai sarana penelitian biomedis, pengujian dan pendidikan. Kaitannya dengan biomedis, mencit digunakan sebagai

model penyakit manusia dalam hal genetika. Hal tersebut karena kelengkapan organ, kebutuhan nutrisi, metabolisme, dan biokimianya cukup dekat dengan manusia.

II.7. KERANGKA TEORI



II.8. KERANGKA KONSEP



Keterangan :

- Variabel bebas
- Variabel tergantung
- Variabel antara
- Variabel Kontrol

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment post test design with control group*.

III.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNHAS. Pembuatan krim ekstrak kulit manggis dilakukan pada Laboratorium Farmasi, Politeknik Farmasi Makassar. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Hasanuddin. Penelitian dilaksanakan Juli - Agustus 2020.

III.3. Populasi Penelitian

Mencit albino usia 6-9 minggu diperoleh dari pusat Veterinary Balitbang Maros. Mencit berasal dari induk yang sama. Mencit dipertahankan selama minimal 1 minggu pada kondisi standar: suhu ruangan (suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), kelembaban $50 \pm 10\%$ dan lampu ruangan dengan siklus 12 jam menyala dan 12 jam dipadamkan

III.4. Sampel Penelitian

III.4.1 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dihitung dengan rumus Federer :

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

Keterangan: n= Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t= Jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$n \geq 5$$

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, sehingga total sampel yang digunakan adalah 25 ekor mencit betina. Besar sampel ini sesuai dengan kriteria WHO (1993) yaitu minimal menggunakan 5 ekor mencit tiap 1 kelompok perlakuan.

III.4.2. Kriteria sampel

III.4.2.1. Kriteria Inklusi

- a. Mencit strain *balb/c*
- b. Usia 6 – 9 minggu
- c. Berat 20 – 30 g
- d. Jenis kelamin betina
- e. Sehat

III.4.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Mencit yang mati selama percobaan
- b. Mencit yang sakit selama percobaan

III.5. Alat dan Bahan

1. Ekstrak kulit buah manggis dibuat di laboratorium farmakognosi fitokimia Politeknik Farmasi. Krim dibuat dari ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn) dengan konsentrasi 1%, 3 % dan 5%.
2. Pengujian Sediaan Krim. Pengujian krim dilakukan meliputi uji organoleptik, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar, uji pH, dan uji iritasi.
3. UVB 311 nm narrow band (Dermalight 1000) dengan kekuatan 450 mJ/cm²

III.6. Cara Kerja

III.6.1 Paparan UVB pada Mencit

Pembagian mencit secara random menjadi 5 kelompok; Kelompok A : Kelompok kontrol UVB, B : Kelompok perlakuan UVB dan pengolesan basecream , Kelompok C : Kelompok perlakuan UVB dan pengolesan ekstrak kulit manggis 1 %, Kelompok D : Kelompok perlakuan UVB dan pengolesan ekstrak kulit manggis 3 % , Kelompok E : Kelompok perlakuan UVB dan pengolesan ekstrak kulit manggis 5 %. Seluruh mencit dicukur bulunya di daerah punggung.

- a. Kelompok A : terdiri dari 5 ekor mencit tanpa dioles ekstrak kulit buah manggis, diberi paparan UVB 450 mJ/cm² 5 menit, tiga kali seminggu sebagai kontrol UVB.

- b. Kelompok B : terdiri dari 5 ekor mencit dioles *basecream* dan diberi paparan UVB 450 mj/cm² 5 menit, tiga kali seminggu selama 4 minggu.
- c. Kelompok C : terdiri dari 5 ekor mencit dioles krim ekstrak kulit buah manggis 1%, 20 menit sebelum diberi paparan UVB 450mj/cm² 5 menit, tiga kali seminggu selama 4 minggu.
- d. Kelompok D : terdiri dari 5 ekor mencit dioles ekstrak kulit buah manggis 3 % 20 menit sebelum diberi paparan UVB 450mj/cm² 5 menit, tiga kali seminggu selama 4 minggu.
- e. Kelompok E : terdiri dari 5 ekor mencit dioles ekstrak kulit buah manggis 5 % 20 menit sebelum diberi paparan UVB 450mj/cm² 5 menit, tiga kali seminggu selama 4 minggu.

Pengolesan tetap dilakukan setiap hari meskipun tanpa paparan UVB. Seluruh mencit dimatikan 24 jam setelah selesai perlakuan, kemudian dilakukan biopsi pada kulit punggung mencit.

III.6.2. Pembuatan ekstrak kulit buah manggis

Kulit buah manggis yang digunakan dalam penelitian ini, diambil zat aktifnya dengan cara ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan cara membersihkan kulit manggis, kemudian dicincang kecil – kecil dan dikeringkan. Kulit yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk. 500 g serbuk kulit manggis dimaserasi di dalam 1 liter etanol 96% selama 48 jam dengan tujuan menarik zat aktif pada bahan yang akan digunakan. Filtrat diperoleh dengan penyaringan. Filtrat dievaporasi menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak.

III.6.3. Pemeriksaan ELISA 8-OHdG (MBS263767)

1. Menambahkan 100 μ L masing masing standar atau sampel
2. Segera tambahkan 100 μ L Biotinylated detection antibody
3. Inkubasi selama 45 menit pada suhu 37 °C
4. Aspirasi dan cuci 3 kali
5. Tambahkan 100 μ L HRP conjugate untuk masing-masing, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C
6. Aspirasi dan cuci 5 kali
7. Tambahkan 90 μ L reagen substrak. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C
8. Tambahkan 100 μ L stop solutio (asam sulfat). Baca pada 450 nm
9. Kalkulasi hasil

III.6.4. Pemeriksaan ELISA CPD (MBS283314)

1. Mempersiapkan reagen, sample dan standar instruksi
2. Menambahkan 100 μ L masing masing standar atau sampel
3. Segera tambahkan 100 μ L Biotinylated detection antibody
4. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
5. Aspirasi dan cuci 3 kali
6. Tambahkan 100 μ L HRP conjugate untuk masing-masing, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
7. Aspirasi dan cuci 5 kali

8. Tambahkan 100 μ L reagen substrak. Inkubasi selama 15 – 20menit pada suhu 37 °C
9. Tambahkan 50 μ L stop solutio (asam sulfat). Baca pada 450 nm

III.6.5. Pengukuran Ekspresi mRNA MMP-1 (Makrogen)

Sampel darah masing masing 100 μ L dicampurkan dengan 900 μ L larutan buffer lisi L6 pada tube yang mempunyai penutup berupa sekrup, kemudian campuran ini disentrifus pada 12 rpm selama 10 menit. Sebanyak, sedimen sampel yang telah dipisahkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Sebelum ditambahkan suspensi diatom, campuran buffer L6 yang telah mengandung RNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3 menit pada kecepatan 12.000 rpm, dengan tujuan agar RNA hasil ekstraksi mengendap di bagian dasar tabung. Suspensi diatom 20 μ L ditambahkan kedalam tabung, suspensi diatom harus selalu divortex dan diaduk dengan menggunakan *gyratory shaker*, kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 divortex kembali menggunakan sentrifus dengan mikrosentrifus eppendorf pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dari setiap vial dipisahkan dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet Pasteur plastik tanpa balon udara dan dihubungkan dengan vacuum pump, untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi tadi, sekitar 10 μ L dari suspensi tersebut dipisahkan. Supernatan dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2. Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, divortex dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, kemudian supernatan dibuang.

Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70 % sebanyak 2 (dua) kali, lalu divortex dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, supernatnya dibuang, endapannya dicuci lagi dengan 1 ml aseton, divortex dan disentrifuse pada 12.000 rpm selama 15 detik kemudian supernatnya dibuang kembali. Aseton yang tersisa dalam endapan (sedimen) diuapkan dengan membuka penutup vial dan dipanaskan dengan oven pada suhu 50-55 C selama kurang lebih 10 menit. Setelah sedimen mengering, TE buffer elusi ditambahkan sebanyak 60 ml, kemudian divortex secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dapat larut. Kemudian vial inkubasi dalam oven pada suhu 56 C selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Supernatan diambil secara hati-hati sebanyak 40-5- µL dari supernatan dan dimasukkan kedalam tabung vial baru. Hasil ekstraksi dapat disismpn pada suhu -20 C atau suhu – 80 C.

III.6.6. Analisis ekspresi mRNA MMP-1(Zhang dkk, 2014)

Ekspresi mRNA dianalisis menggunakan metode *Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) dengan SYBR Green qRT-PCR Supermix (Abcam, MA, USA). Template DNA yang akan digunakan pada real time PCR dibuat dari 5 µg dari total RNA direaksikan dalam 20 µL yang terdiri dari 0,5 µg oligo (dT), 10 µM dNTPs dalam 1 µL superscript II reserve transcriptase pada suhu 42 C selama 50 menit. PCR mixture terdiri dari template cDNA dari RT, 10 pmol setiap primer, 25 µL iQ SYBR Green supermix (Bio Rad) dan air steril pada

volume reaksi 50 μ L. Primer Forward untuk MMP-1 : GCTAACCTTTGATGCTATAACTACGA. Primer Reverse untuk MMP-1 TTTGTGCGCATGTAGAATCTG. Parameter siklus termal adalah 3 menit pada suhu 95 C dan 40 siklus denaturasi pada suhu 95 C selama 30 detik, 55 C selama 30 detik dan 68 C selama 1 menit. GAPDH digunakan sebagai *housekeeping gene*.

III.6.7. Pemeriksaan Histopatologi

Sampel jaringan difiksasi dalam bufer formalin 10%. Semua jaringan diletakkan dalam blok parafin dan dipotong dengan ketebalan 4-5 μ M. Tiap bagian yang dipotong kemudian dideparafinasi dengan *xylene* dan dibagi skala dengan serial alkohol ke air kemudian diwarnai dengan *Masson's Trichrome* dan evaluasi standar dengan mikroskop olympus CV.

Sediaan histopatologis diperoleh dari jaringan kulit punggung mencit yang dibiopsi eksisi. Setiap spesimen difiksasi dengan *buffer* formalin. Potongan kemudian diletakkan pada tempat yang rata dan di tengahnya dipotong menjadi 2 bagian. Pembuatan *slide* diambil dari potongan jaringan di tengahnya yang dipotong tegak lurus dengan ketebalan 4 μ M kemudian dilakukan pewarnaan *Masson's Trichrome*.

III.6.7.1 Prosedur Pengambilan Sediaan Biopsi Kulit

- a. Cuci tangan dan keringkan, pasang masker dan sarung tangan steril.
- b. Matikan mencit dengan menggunakan eter secara inhalasi .

- c. Tandai daerah lesi kulit yang aktif dengan *marker*.
- d. Bersihkan daerah lesi dan kulit sekitar dengan larutan antiseptik yang dibasahi pada kasa steril.
- e. Tutup dengan duk steril.
- f. Lakukan eksisi elips kemudian hasil biopsi eksisi dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *buffer* formalin 10% yang telah diberi tanggal pengambilan.
- g. Hasil biopsi ini lalu disimpan dalam blok parafin (*wax*) untuk kemudian dilakukan pemotongan (*cutting*) dengan mikrotom ketebalan 4 μ M sesuai kebutuhan untuk memperoleh sayatan yang sangat halus dan rapi.

III.6.7.2 Pewarnaan *Masson's Trichome*

- a. Slide di-deparafinasi dan rehidrasi dengan 100% alkohol, 95% alcohol, 70 % alkohol
- b. Slide dicuci dengan Aquades
- c. Untuk jaringan yang difiksasi dengan formalin, refiksasi dengan larutan Bouin's selama 1 jam pada suhu 56°C untuk meningkatkan kualitas pengecatan
- d. Slide direndam dengan air mengalir selama 5 – 10 menit untuk menghilangkan warna kuning
- e. Slide dicat dengan larutan kerja *Weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit
- f. Slide direndam dengan air mengalir yang hangat selama 10 menit

- g. Slide dicuci dengan Aquades
- h. Slide dicat dengan larutan *Biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 10 – 15 menit
- i. Slide dicuci dengan aquades
- j. Slide di differensiasi dengan larutan *phosphomolybdic-phosphotungstic acid* selama 10 – 15 menit atau sampai warna kolagen tidak merah
- k. Slide langsung dicat (tanpa direndam) dengan larutan *Anilin Blue* selama 5 – 10 menit. Slide direndam sesaat di Aquades dan didifferensiasi dengan larutan asam asetat 1% selama 2 – 5 menit
- l. Slide dicuci dengan Aquades
- m. Slide di-dehidarasi dengan cepat menggunakan etil alkohol 95%, etil alkohol absolut (langkah ini akan menghilangkan cat *Biebrich scarletacid fuchsin*) dan slide dibersihkan dengan xylene
- n. Slide ditaruh di atas medium yang memiliki resin.

III.7. Definisi Operasional

1. Kulit buah manggis adalah bagian terluar dari buah manggis yang berwarna merah keunguan. Mempunyai bobot 62,84 % bila dibandingkan dengan buahnya. Kandungannya 95 % *xanton*, lainnya adalah *isoflavin*, *tannin*, dan *flavonoid*.
2. Ekstrak kulit manggis

Kulit manggis yang didapatkan diproses dengan pelarut etanol di laboratorium farmakognosi fitokimia Politeknik Farmasi.

3. Mencit, merupakan hewan yang masuk dalam familia dari kelompok mamalia. Mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah spesies swiss albino mice betina berumur 6-9 minggu dengan berat 15-25 gr.
4. Ultraviolet B adalah salah satu jenis sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 290-320 nm. Sinar UV pada penelitian ini didapat dari UVB 311 nm narrow band (dermalight 1000) dengan kekuatan 450 mj/cm
5. Fotoproduk yang terbentuk secara langsung adalah fotoproduk yang terbentuk akibat absorpsi UVB 343 mJ/cm² oleh DNA secara langsung berupa *Cyclobutyl pyrimidine dimer* (CPD) yang diketahui dengan pemeriksaan ELISA
6. Fotoproduk yang terbentuk secara tidak langsung adalah fotoproduk yang terbentuk akibat absorpsi UVB 343 mJ/cm² oleh *chromofor* dan menimbulkan *kerusakan DNA melalui pembentukan ROS* dan diketahui dengan pemeriksaan *8-hydroxy'deoxyguanosin* (8-OHdG) menggunakan antibodi 8-OHdG dan jumlahnya dihitung berdasarkan pemeriksaan ELISA.
7. Matriks metalloproteinase-1 (MMP-1) dikenal juga sebagai interstitial collagenase dan fibroblast collagenase yaitu suatu enzim pada manusia yang disandikan oleh gen MMP-1. Kadar MMP-1

merupakan nilai yang didapatkan dari hasil pemeriksaan PCR dan jaringan yang diperiksa

8. Pewarnaan *Masson's Trichrome*

Pewarnaan *Masson's Trichrome* adalah protokol pewarnaan tiga warna yang digunakan pada pemeriksaan histologi. Pewarnaan ini akan menghasilkan warna merah untuk keratin dan serabut otot; warna biru atau hijau pada kolagen dan tulang; warna merah muda/pink untuk sitoplasma; warna coklat tua atau hitam pada nukleus.

9. Kolagen

Kolagen adalah protein (polipeptida) ekstraselular yang merupakan jaringan ikat di dalam dermis yang diproduksi oleh fibroblast. Kolagen pada penelitian ini diambil dari jaringan kulit dari punggung mencit yang telah terpapar sinar UVB. Perhitungan ketebalan kolagen dengan menggunakan mistar dalam ukuran cm pada kertas print gambar.

III.8. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik (Ethical Approval)

Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

III.9. Alur Penelitian

