

**THE EFFECT OF BOTTO-BOTTO  
(*Chromolaena odorata* L.) CREAM TOWARD MMP-1 AND  
TGF BETA-1 EXPRESSIONS, AND HISTOPATOLOGY OF  
COLLAGEN INDUCED BY PHOTOAGING WITH UVB OF  
BALB/C MICE**

EFEK KRIM BOTTO-BOTTO (*Chromolaena odorata* L.)  
TERHADAP EKSPRESI MMP-1, TGF BETA-1, DAN  
HISTOPATOLOGI KOLAGEN PADA MENCIT BALB/C YANG  
DIINDUKSI FOTOAGING MENGGUNAKAN SINAR UVB

Disertasi  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi  
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

KARLINA AMIR TAHIR  
C013181026



PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021

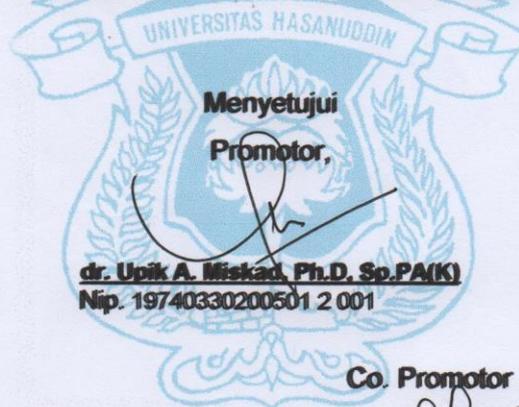
**DISERTASI**

**EFEK KRIM BOTTO - BOTTO (*Chromolaena odorata* L.)  
TERHADAP EKSPRESI MMP-1, TGF BETA-1, DAN HISTOPATOLOGI KOLAGEN  
PADA MENCIT BALB/c YANG DIINDUKSI FOTOAGING MENGGUNAKAN SINAR UVB**

Disusun dan diajukan oleh

**KARLINA AMIR TAHIR  
C013181026**

*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin  
pada tanggal, 7 Juli 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*



**Menyetujui  
Promotor,**

**dr. Urip A. Miskah, Ph.D. Sp.PA(K)**  
Nip. 19740330200501 2 001

**Co. Promotor**

**Dr. dr. Khairuddin Diawad, Sp.KK(K), FINSDV, FAADV**  
Nip. 19660213199603 1 001

**Co. Promotor**

**Prof. Dr. Sartini, M.Si, Apt**  
Nip. 196111111198703 2 001

**Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,**

**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

**Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,**

  
**Prof. dr. Budy, Ph.D, Sp.MK(K), M.Med.Ed**  
Nip. 19661213 199603 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : KARLINA AMIR TAHIR  
Nomor mahasiswa : C013181026  
Program studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari disertasi ini terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 1 Juli 2021



Menyatakan

**KARLINA AMIR TAHIR**

## PRAKATA

Bismillaahirrohmanirrohiim.

Dengan menyebut Asma Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas kasih sayang-Nya penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Untuk itu penulis mengucapkan rasa syukur kehadiran-Nya seraya mengucapkan segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam, dengan terselesaikannya disertasi ini yang merupakan salah satu persyaratan akademik guna memperoleh gelar Doktor dalam Program Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Judul yang diangkat dalam disertasi ini adalah Efek Krim Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) terhadap Ekspresi MMP-1, TGF Beta-1, dan Histopatologi Kolagen pada Mencit BALB/c yang Diinduksi Fotoaging menggunakan Sinar UVB.

Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada dr. Upik A. Miskad, Ph. D., Sp. PA (K) sebagai promotor, Dr. dr. Khairuddin Djawad, Sp. KK (K) sebagai Kopromotor I, Prof. Dr. Sartini, MS., Apt sebagai Kopromotor II, yang dengan ketulusan hati telah menyediakan waktu memberikan bimbingan, perhatian dan dorongan serta semangat kepada penulis selama penyelesaian disertasi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada para penguji yaitu dr. Arief Budiyanto, Ph.D, Sp.KK (K) sebagai penguji eksternal, Prof. Dr. Natsir Djide, MS., Apt, Dr. dr. Farida Ilyas, Sp.KK (K), dr. Aminuddin, M.Nut & Diet., Ph.D., Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes., Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS., sebagai penguji

internal yang telah banyak memberikan masukan, saran, koreksi, dorongan, serta dukungan untuk penyempurnaan disertasi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis *sampaikan* kepada Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A, Dekan Fakultas Kedokteran, Prof. Budu., Ph.D., Sp. M (K), Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. Ketua Program Studi dr. Agussalim Bukhari M.Med.,Ph.D.,Sp.GK (K) yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat menempuh jenjang pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Agama melalui Program Beasiswa 5000 Doktor, Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Dr. dr. Syatirah Djalaluddin, Sp. A (K), Ketua Jurusan Farmasi Asrul Ismail, M.Pharm.Clin., Apt yang telah mendukung secara finansial dan mengakomodir pelaksanaan penelitian kami.

Penghargaan yang tak terhingga atas doa, perhatian, dan dukungan yang tulus ayahanda tercinta Amir Tahir, ibunda tercinta A. Mardiawati Razak, bapak dan ibu mertua (alm.) bapak H. Lahiya dan ibunda Hj. Habbasia. Terima kasih kepada Suami tercinta Ahmad Lalo, M.Si., Apt atas kesabaran, dukungan, dan doa, buat anak tersayang Khairina Dactylifera Ahmad Lalo yang telah hadir menyempurnakan kehidupan kami semoga menjadi Qurrota A'yun Ummiti dan Abbati.

Saudara dan ipar tercinta atas doa, kesabaran, dan pengorbanannya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini dan terimakasih buat teman-teman angkatan 2018 atas doa dan semangatnya.

Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis mulai dari awal penelitian hingga dapat menyelesaikan pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan keberkahan-Nya pada kita semua.

Makassar, 1 Juli 2021

Penulis

Karlina Amir Tahir

## ABSTRAK

**KARLINA AMIR TAHIR.** *Efek Krim Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) terhadap Ekspresi MMP-1, TGF Beta-1, dan Histopatologi Kolagen pada Mencit BALB/c yang Diinduksi Fotoaging menggunakan Sinar UVB (dibimbing oleh Upik A. Miskad, Khairuddin Djawad, dan Sartini)*

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian krim daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) terhadap efek perlindungan pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB melalui ekspresi MMP-1, TGF Beta-1, ketebalan dan kerapatan kolagen.

Ada dua puluh empat ekor mencit BALB/c dibagi menjadi empat kelompok, kelompok I (Kontrol Normal), kelompok II (Kontrol Negatif Basis Krim+UVB), kelompok III (Kontrol Positif UVB), kelompok IV (Perlakuan Krim Botto-Botto+UVB). Ekspresi mRNA dan protein MMP-1, TGF Beta-1, ketebalan dan kerapatan kolagen diperiksa dengan metode Imunohistokimia, RT-PCR, dan histopatologi. Data yang dihasilkan kemudian dianalisis menggunakan Kruskal-Wallis Test, Oneway ANOVA, Mann-Whitney U dan Tukey HSD.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa melalui uji Kruskal-Wallis Test ada perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi MMP-1, TGF Beta-1, dan kerapatan kolagen. Hasil uji Oneway ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap ketebalan kolagen antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Hasil uji lanjutan Mann-Whitney U dan Tukey HSD menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kelompok IV terhadap kelompok II dan III dan tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok IV terhadap kelompok I. Jumlah tertinggi ekspresi TGF Beta-1, ketebalan dan kerapatan kolagen dan jumlah terendah ekspresi MMP-1 ditemukan pada kelompok IV dengan perlakuan Krim Botto-Botto+UVB dibandingkan dengan kelompok II dan III. Krim Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) dapat secara efektif melindungi kulit terhadap fotoaging melalui pencegahan peningkatan ekspresi MMP-1, dan pencegahan penurunan ekspresi TGF Beta-1, ketebalan dan kerapatan kolagen.

Kata kunci. *Chromolaena odorata* L., MMP-1, TGF Beta-1, Kolagen



## ABSTRACT

**KARLINA AMIR TAHIR.** *The Effect of Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) Cream Toward MMP-1 and TGF Beta-1 Expressions, and Histopatology of Collagen Induced by Photoaging with UVB of BALB/C Mice* (supervised by Upik A. Miskad, Khairuddin Djawad, and Sartini).

The aim of the research is to determine the effect of botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) leaf cream on the protective effect of skin of BALB/c mice experiencing the photoaging due to the exposure to UVB rays through the expressions of MMP-1, TGF Beta-1, and the collagen thickness and density.

The research used 24 BALB/c mice divided into four groups, namely: group I (Normal Control), group II (Negative Control Cream+UVB), group III (UVB Positive Control), group IV (botto-botto Cream+UVB treatment). MMP-1 mRNA and protein expression, TGF Beta-1, collagen thickness and density were examined using the immunohistochemistry, RT-PCR, and histopathological methods. The data produced were then analyzed using the Kruskal-Wallis Test, Oneway ANOVA, Mann-Whitney U and Tukey HSD test..

Kruskal-Wallis Test result indicates the significant difference on MMP-1, TGF Beta-1 expressions, and collagen density. The Oneway ANOVA test result indicates the significant difference on the collagen thickness of inter-groups ( $p < 0.05$ ). The advanced Mann-Whitney U and Tukey HSD test results indicate that there is the significant difference between group IV and groups II and III, and there is no significant difference between group IV and group I. The highest amount of TGF Beta-1 expression, collagen thickness and density, and the lowest amount of MMP-1 expression are found in group. IV with botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) Cream+UVB treatment compared groups II and III. Thus, botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) cream can effectively protect the skin against photoaging by preventing the increase in MMP-1 expression and preventing the decrease of TGF Beta-1 expression, and collagen thickness and density.

Key words: *Chromolaena odorata* L., MMP-1, TGF Beta-1, Collagen



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
PRAKATA .....	iv
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
I. PENDAHULUAN .....	1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. RUMUSAN MASALAH.....	5
C. TUJUAN PENELITIAN .....	6
D. MANFAAT PENELITIAN .....	7
II. TINJAUAN TEORITIS .....	9
A. URAIAN TANAMAN .....	9
B. FLAVONOID .....	10
C. RADIKAL BEBAS.....	13
D. ANTIOKSIDAN.....	14
E. EKSTRAKSI .....	16
F. KULIT.....	20
G. PENUAAN KULIT.....	22
H. KRIM .....	25
I. SINAR ULTRAVIOLET-B (UVB) .....	33
J. METALLOPROTEINASE DAN MMP-1 .....	34
K. TGF BETA-1 .....	37
L. KOLAGEN.....	38
M. KERANGKA TEORI .....	41
N. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	42
O. HIPOTESIS PENELITIAN.....	43
III. METODE PENELITIAN .....	44
A. JENIS DAN DESAIN PENELITIAN .....	44
B. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN .....	44
C. IDENTIFIKASI & DEFENISI OPERASIONAL VARIABEL PENELITIAN .....	45
D. POPULASI DAN TEKNIK SAMPEL .....	48
E. KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) .....	48
F. BESAR SAMPEL PENELITIAN .....	49
G. ALAT DAN BAHAN .....	49
H. PROSEDUR PENELITIAN .....	50
I. PEMUSNAHAN HEWAN COBA .....	82
J. ALUR PENELITIAN .....	83
K. ANALISIS DATA .....	84

L. MASALAH ETIKA.....	84
IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	85
A. HASIL PENELITIAN.....	85
B. PEMBAHASAN .....	106
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	123
A. KESIMPULAN.....	123
B. SARAN .....	124
DAFTAR PUSTAKA.....	125
LAMPIRAN .....	134

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Indikator kekuatan antioksidan .....	59
2. Formulasi krim daun Botto-Botto .....	63
3. Evaluasi reaksi kulit .....	81
4. Kategori sifat mengiritasi .....	82
5. Hasil ekstraksi daun Botto-Botto.....	86
6. Hasil partisi daun Botto-Botto .....	86
7. Hasil skrining fitokimia kandungan daun botto-botto .....	86
8. Hasil uji kadar polifenol total dan flavonoid total.....	87
9. Hasil uji antioksidan metode DPPH, ABTS dan FRAP .....	87
10. Hasil uji tipe emulsi sebelum dan setelah kondisi penyimpanan dipercepat .....	88
11. Hasil uji organoleptis krim sebelum dan setelah kondisi penyimpanan dipercepat .....	90
12. Hasil uji homogenitas krim sebelum dan setelah kondisi penyimpanan dipercepat .....	90
13. Hasil uji viskositas krim sebelum dan setelah kondisi dipercepat	91
14. Hasil uji pH krim sebelum dan setelah kondisi dipercepat.....	92
15. Hasil uji daya sebar krim sebelum dan setelah kondisi dipercepat .....	92
16. Rata-rata bobot badan pada masing-masing kelompok.....	93
17. Rata-rata umur mencit pada masing-masing kelompok .....	94
18. Rata-rata jumlah ekspresi MMP-1 pada pengamatan immunohistokimia.....	96
19. Uji beda lanjut Mann-Whitney U rata-rata ekspresi pada pengamatan immunohistokimia MMP-1.....	96
20. Rerata jumlah ekspresi TGF BETA-1 pada pengamatan immunohistokimia.....	98
21. Uji beda lanjut Mann-Whitney U rata-rata ekspresi pada pengamatan immunohistokimia TGF Beta-1 .....	99
22. Rata-rata ketebalan kolagen dengan pengamatan histopatologi.	101
23. Uji beda lanjut Tukey HSD rata-rata ketebalan kolagen pada pengamatan histopatologi.....	101
24. Rata-rata kerapatan kolagen dengan pengamatan histopatologi	103
25. Uji beda lanjut Mann-Whitney U rata-rata kerapatan kolagen pada pengamatan histopatologi.....	103
26. Rata-rata ekspresi mRNA MMP-1 .....	105
27. Uji beda lanjut Mann-Whitney U rata-rata ekspresi mRNA MMP-1 .....	105
28. Hasil uji iritasi .....	106

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Tanaman Botto-Botto ( <i>Chromolaena odorata</i> , L.) .....	9
2. Kerangka dasar flavonoid .....	11
3. Tiga dimensi anatomi kulit .....	22
4. Morfologi kulit muda, kulit dengan penuaan intrinsik dan ekstrinsik .....	24
5. Rumus struktur asam stearat .....	28
6. Rumus struktur setil alkohol .....	29
7. Rumus struktur gliserin .....	29
8. Rumus struktur fenoksietanol .....	30
9. Rumus struktur DMDM hydantoin .....	30
10. Rumus struktur propilen glikol .....	31
11. Rumus struktur alfa tokoferol .....	32
12. Jalur <i>signaling</i> utama yang terlibat dalam proses penuaan kulit yang diinduksi oleh UVB .....	34
13. Diagram skema peranan MMP pada fotoaging .....	36
14. Kolagen dan elastin .....	40
15. Grafik rata-rata ekspresi MMP-1 pada pengamatan immunohistokimia .....	94
16. Ekspresi MMP-1 menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 200 x .....	95
17. Grafik rata-rata ekspresi TGF Beta-1 pada pengamatan immunohistokimia .....	97
18. Ekspresi TGF Beta-1 menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 200 x .....	97
19. Grafik rata-rata ketebalan kolagen pada pengamatan histopatologi .....	99
20. Ketebalan kolagen menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 200 x .....	100
21. Grafik rata-rata kerapatan kolagen pada pengamatan histopatologi .....	102
22. Kerapatan kolagen menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 200 x .....	102
23. Grafik rata-rata ekspresi mRNA MMP-1 .....	104

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Izin etik.....	134
2. Hewan Coba (BALB/c) .....	135
3. Determinasi Tumbuhan .....	136
4. Ekstraksi, partisi dan freeze dryer sampel daun botto-botto.....	137
5. Identifikasi golongan senyawa .....	139
6. Kurva baku asam gallat untuk uji polifenol total .....	142
7. Kurva baku kuersetin untuk uji flavonoid total .....	143
8. Persamaan regresi baku asam askorbat untuk uji antioksidan metode DPPH .....	144
9. Persamaan regresi baku asam askorbat untuk uji antioksidan metode ABTS.....	145
10. Kurva baku asam askorbat untuk uji antioksidan metode FRAP .....	146
11. Pembuatan dan evaluasi stabilitas krim.....	147
12. Intervensi sinar UVB pada hewan coba .....	148
13. Prosedur IHK.....	149
14. Statistik Berat badan mencit .....	156
15. Statistik Usia mencit .....	158
16. Statistik MMP-1 .....	160
17. Statistik TGF BETA-1 .....	165
18. Statistik Ketebalan Kolagen.....	170
19. Statistik Kerapatan Kolagen .....	173
20. Statistik mRNA MMP-1 .....	178
21. Gambar IHK MMP-1 .....	183
22. Gambar IHK TGF-Beta.....	186
23. Gambar histopatologi ketebalan kolagen .....	189
24. Gambar histopatologi kerapatan kolagen.....	192
25. Uji iritasi.....	195

## DAFTAR SINGKATAN

UV-B	: Ultraviolet B
MMP-1	: Metalloproteinase 1
TGF Beta-1	: Transforming Growth Factor Beta-1
AP-1	: Activator Protein 1
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	: Ferric Reducing Assay Power
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ROS	: Reactive Oxygen Species
MMPs	: Matriks Metalloproteinases
MES	: Matriks Ekstraseluler
RT-PCR	: Real Time- Polimerase Chain Reaction
g	: gram
A/M	: Tipe emulsi air dalam minyak
dkk	: Dan kawan-kawan
IC <sub>50</sub>	: Inhibitor concentration, konsentrasi peredaman radikal bebas sebesar 50%
µg/ml	: Mikrogram/mililiter
UV-Vis	: Ultra violet – Visible
pH	: Power of hidrogen, kekuatan asam basa
IHK	: Imunohistokimia

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kulit adalah organ terbesar dari tubuh manusia terdiri dari total luas permukaan sekitar 1,5 – 2,0 m<sup>2</sup> yang berkontak langsung dengan lingkungan luar dan membentuk *barrier*/penghalang yang efektif terhadap pengaruh buruk lingkungan dan bahan asing untuk melindungi organ dalam dari tubuh. Penuaan pada kulit merupakan hal yang kompleks, melibatkan proses multifaktor dimana kulit bisa mengalami penuaan intrinsik (faktor usia, genetik, hormon) dan penuaan ekstrinsik (paparan radiasi dan polutan). Faktor luar yaitu penuaan akibat paparan sinar radiasi, dikenal dengan **fotoaging** dan radiasi ini merupakan faktor utama penyebab terjadinya fotoaging (Jenkins, 2002; Lorencini dkk., 2014; Sanches dkk., 2014).

Fotoaging mempengaruhi sekitar 90% dari semua perubahan pada kulit (Farage dkk., 2008), ditandai dengan noda hitam, pigmentasi, penampilan kulit yang kasar, kerutan, mengurangi kekenyalan, dan kulit kering (Bosch dkk., 2015; Gilchrest, 2013; Fisher dkk., 2002; Ganceviciene dkk., 2012; Berneburg dkk., 2004).

Sinar ultraviolet (UV), utamanya ultraviolet-B (UVB) mengandung energi yang lebih besar dan dapat menyebabkan

*sunburn*, penggelapan kulit (tanning), supresi sistem imun, fotoaging, dan *photocarcinogenesis* (Biniek dkk., 2012).

Radiasi sinar UV menginduksi pembentukan ROS (Reactive Oxygen Species) dan kerusakan DNA, menyebabkan peningkatan produksi metalloproteinase (MMP) dan menurunkan produksi kolagen pada fibroblast (Kim dan Park, 2016). Pemaparan kronik sinar UV dapat merubah komposisi ketebalan kolagen pada matriks ekstraselular (MES), perubahan kronik pada struktur kulit dan fungsinya (Hwang dkk., 2011).

Matriks ekstraselular (MES) terdiri dari jaringan penghubung dan protein dasar membran seperti kolagen, elastin dan proteoglikan yang bertanggung jawab terhadap kekuatan dan kekenyalan kulit (Berneburg dkk., 2000) (Kim dan Park, 2016). Pada kulit muda, jumlah kolagen tipe I terdiri dari 80% dan tipe III hingga 15% (Tobin, 2016). Radiasi sinar UV pada kulit manusia dapat meningkatkan level dari beberapa matriks metalloproteinase (MMPs atau kolagenase) termasuk MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 (Fisher dkk., 1996; Brenneisen dkk., 2002). MMP-1, kolagenase fibroblast merupakan enzim protease utama yang paling banyak bertanggung jawab terhadap pemecahan komponen MES di dermis dan menginisiasi degradasi kolagen khususnya tipe I dan III pada kulit manusia secara *in vivo* (Dong dkk., 2008; Iyer dkk., 2006; Quan dkk., 2009; Fisher dkk., 2002). Sinar UV juga mendorong penurunan ekspresi Transforming Growth Factor-Beta

(TGF-Beta), yaitu suatu sitokin yang merangsang produksi kolagen (Choi, dkk., 2007 ; Tanaka, dkk., 2008) sehingga menyebabkan penurunan pembentukan kolagen (Helfrich dkk., 2008; Lim, 2012).

Ada beberapa cara untuk mengurangi kerusakan kulit dari radikal bebas akibat sinar UV, yaitu menghindari paparan UV yang berlebihan, pemakaian pakaian pelindung sinar UV, pemakaian tabir surya, obat topikal vitamin A atau turunannya, atau obat topikal yang mengandung antioksidan, serta mengkonsumsi antioksidan, baik yang terdapat pada makanan maupun berupa suplemen (Baumann & Allemann, 2009 ; Burke, 2010).

Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan alami yaitu daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.). Botto-botto termasuk dalam suku Asteraceae dan terdapat banyak di Sulawesi Selatan. Penggunaan secara tradisional *Chromolaena odorata* L. sebagai sumber obat telah banyak digunakan di negara Afrika Barat, negara-negara Asia, dan Indonesia sebagai penyembuh luka, antibakteri, antimalaria, antiinflamasi, antioksidan, antituberkulosis, analgesik dan antiimunopresif, antiproliferasi, sitotoksik, antifungi, antikanker payudara, dan aktivitas lainnya (Ezenyi dkk., 2014; Aitebirenam dkk., 2015 (Fitrah, 2016; Hamzah dkk., 2017). Kandungan senyawa fitokimia dari *Chromolaena odorata* L., diantaranya **flavonoid** termasuk kuersetin, sinensetin, sakuranetin, padmatin, kaempferol, salvagenin, asam fenolik (Kavita, 2013;

Vijayaraghavan dkk., 2017). Penelitian lain oleh Parameswari tahun 2012 yang menguji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun *Chromolaena odorata* menggunakan beberapa uji yaitu ABTS, DPPH, dan FRAP, dimana hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas dan antioksidan yang **poten**. Pada metode ABTS, aktivitas penghambatan dari *Chromolaena odorata* pada konsentrasi 200 µg hingga 1000 µg adalah 29,92 – 63,34%. Demikian juga halnya dengan menggunakan metode DPPH dengan baku pembanding asam askorbat, aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun *Chromolaena odorata* L dan standar asam askorbat secara berturut-turut yaitu 24,68 – 61,78% dan 32,23 – 68,08% pada konsentrasi 200 – 1000 µg dengan nilai IC<sub>50</sub> *Chromolaena odorata* L., sebesar 780 µg dan asam askorbat 600 µg. Pada uji FRAP, ekstrak pada konsentrasi 200 – 1000 µg berada pada range nilai 0,07 – 0,17% sedangkan standar asam askorbat pada nilai 0,08 – 0,19%.

Efek antifotoaging dari senyawa flavonoid mampu menurunkan ekspresi MMP-1 menggunakan sel HDF (Human Dermal Fibroblast) dan HaCaT (Human Keratinocytes) (Hwang dkk., 2011; Choi dkk., 2017) Penelitian terkait efek antioksidan dari bahan alam terhadap pengaruh buruk sinar UVB telah banyak dilakukan yaitu diantaranya oleh Budiyanto dkk., (2000) meneliti tentang efek perlindungan dari penggunaan topikal minyak zaitun terhadap *photocarcinogenesis*, hasilnya minyak zaitun secara efektif

menurunkan tumor kulit pada hewan uji *hairless mice*, Anwar dkk., (2016) menguji efektivitas kulit buah manggis terhadap angiogenesis dimana konsentrasi ekstrak 50% (2 mg/g berat badan mencit) mampu mengurangi jumlah angiogenesis. Demikian juga penelitian oleh Khairi dkk., (2019) menguji efek dari krim ekstrak klika falloak terhadap ekspresi MMP-1 dan kolagen, hasilnya bahwa krim ekstrak mampu menurunkan ekspresi MMP-1 dan meningkatkan kerapatan dan densitas kolagen. *Chromolaena odorata* L., memiliki aktivitas antioksidan yang poten sehingga dalam penelitian ini akan dikembangkan dalam bentuk sediaan krim untuk pengujian antifotoaging pada mencit BALB/c dengan parameter uji ekspresi MMP-1, TGF Beta-1, dan histopatologi kolagen.

## **B. Rumusan Masalah**

1. Berapakah aktivitas antioksidan dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) melalui penangkapan radikal bebas (*Free Radical Scavenging*) dengan metode DPPH, FRAP dan ABTS ?
2. Bagaimanakah stabilitas fisik krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) ?
3. Apakah krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) dapat mencegah peningkatan ekspresi protein MMP-1 dan mencegah penurunan ekspresi TGF Beta-1 pada mencit

BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji IHK (Immunohistokimia) ?

4. Apakah krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) mampu mencegah penurunan ketebalan dan kerapatan kolagen pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji histopatologi?
5. Apakah krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) mampu mencegah peningkatan ekspresi mRNA MMP-1 pada mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji RT-PCR ?
6. Bagaimanakah uji iritasi krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) ?

### **C. Tujuan Penelitian**

#### 1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) terhadap efek perlindungan pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB.

#### 2. Tujuan Khusus

1. Memperoleh aktivitas antioksidan dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.).
2. Menghasilkan krim yang stabil secara fisik dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.).

3. Memperoleh krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) yang mampu mencegah peningkatan ekspresi protein MMP-1 dan mencegah penurunan ekspresi protein TGF Beta-1 pada mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB menggunakan uji IHK.
4. Memperoleh krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) yang mampu mencegah penurunan ketebalan dan kerapatan kolagen pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB.
5. Memperoleh krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) yang mampu mencegah peningkatan ekspresi mRNA MMP-1 pada mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB menggunakan uji RT-PCR.
6. Menghasilkan krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) yang tidak mengiritasi.

#### **D. Manfaat Penelitian**

1. Aspek Pengembangan Ilmu
  - a. Penelitian ini memberi informasi ilmiah tentang manfaat krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) terhadap efek perlindungan pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB.
  - b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan rujukan penelitian efek perlindungan pada kulit yang mengalami fotoaging akibat

paparan sinar UVB selanjutnya, khususnya yang berhubungan dengan formula stabil, aktivitas antioksidan, ekspresi MMP-1 dan TGF Beta-1, dan histopatologi kulit.

## 2. Aspek Aplikasi

- a. Memanfaatkan potensi daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) sebagai perlindungan pada kulit yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB.
- b. Memperoleh krim dari fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) yang dapat digunakan sebagai perlindungan pada kulit yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB.

## BAB II

### TINJAUAN TEORITIS

#### A. Uraian Tanaman

##### 1. Klasifikasi

Regnum : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo : Asterales

Famili : Asteraceae

Genus : *Chromolaena*

Spesies : *Chromolaena odorata* L.

(Gembong, 2010).



Gambar 1. Tanaman Botto-botto (*Chromolaena odorata* L.)

##### 2. Nama Lain

Laruna, Kopasanda (Makassar), Kirinyu (Sunda), Siam Weeds (Inggris), Elizabeth (Nigeria), Independence Leaf (Nigeria), Triffed Weeds, Bitter Bush/Jack in the Bush, Pokok Kapal Terbang atau Aeroplane Plant, Pokok Jerman (Vijayaraghavan dkk, 2017) (Fitrah, 2016).

##### 3. Kandungan Kimia

Monoterpen, hidrokarbon sesquiterpen, triterpen/steroid, alkaloid, dan flavonoid termasuk salvigenin, sakuranetin, isosakuranetin, kaempferide, betulenol, 2–5–7–3 tetra-O-metil quersetagetin,

kuersetin, sinensetin, sakuranetin, padmatin, kaempferol, salvagenin, asam fenolik, tamarixetin, dan dua kalkon, odoratin, dan senyawa alkoholik, minyak esensial (geygreen, bornil asetat, beta eubeden), saponin triterpenoid, tannin, asam organik, fenol, alkaloid, campuran kompleks aglikon flavonoid lipofilik (flavanon, flavonol, flavon, kalkon) (Zhang dkk., 2012; Heiss dkk., 2014; Nguyen dan Le., 1993, Vijayaraghavan dkk, 2017; Hamzah dkk, 2017).

#### **4. Kegunaan**

Penyembuhan luka, antiinflamasi, antiproliferasi, antioksidan, antidiabetes, antiinflamasi, antitumor, antibakteri, antimalaria, antituberkulosis, antiproliferasi, analgesik (Varma dkk., 2014; Vijayaraghavan dkk., 2017; Hamzah dkk., 2017; Fitrah, 2016).

#### **5. Habitat**

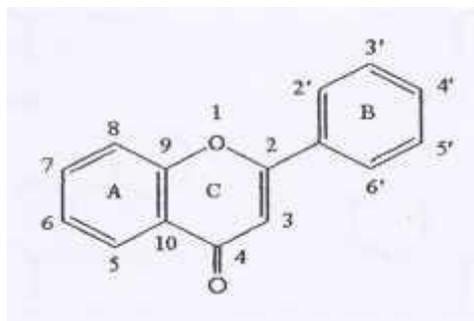
Area perkebunan, hutan alami, hutan tanaman, padang rumput, tepi sungai, semak belukar (Bennett dan Rao, 1968).

## **B. Flavonoid**

### **1. Uraian Umum Flavonoid**

Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol alam yang dalam tumbuhan merupakan aglikon mengandung 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzen yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier terdiri dari 3 atom C<sub>6</sub> dan 3 atom karbon sehingga mempunyai struktur dasar C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Setiap atom

$C_6$  yang merupakan cincin benzen yang dihubungkan dengan tiga atom karbon ( $C_3$ ) rantai alifatis yang dapat pula membentuk cincin ketiga. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid (Markham, 1988).



Gambar 2. Kerangka dasar flavonoid

Semua varian flavonoid saling berkaitan karena alur biosintesis yang sama, yang memasukkan pra zat dari alur sikimat dan alur asetat-malonat. Flavonoid pertama dihasilkan segera setelah kedua jalur itu bertemu. Flavonoid yang dianggap pertama kali terbentuk pada biosintesis ialah khalkon dan semua bentuk lain diturunkan dari khalkon melalui berbagai alur. Modifikasi flavonoid lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan penambahan atau pengurangan hidroksilasi, metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; metilnasi gugus orto-dihidroksil; dimerisasi (pembentukan biflavonoid); pembentukan bisulfat; dan yang terpenting, glikosilasi

gugus hidroksil (pembentukan flavonoid O-glikosida) atau inti flavonoid (pembentukan flavonoid C- glikosida) (Markham, 1988).

## **2. Klasifikasi flavonoid**

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Markham, 1988).

Senyawa-senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan dari sistem 1,3-diarilpropan. Dalam hal ini, flavon mempunyai tingkat oksidasi yang terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa-senyawa turunan flavon (Markham, 1988).

Penggolongan heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksigen pada atom C<sub>3</sub> menentukan sifat, khasiat, dan golongan atau tipe flavonoid. Perbedaan pola distribusi dan hidroksilasi pada atom C<sub>3</sub> juga menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavanol, flavanonol, isoflavon, auron, kalkon. Bagian terbesar adalah flavon dan flavanol (Markham, 1988).

Flavonoid dalam jaringan tumbuhan digolongkan pada awalnya berdasarkan sifat kelarutan dan reaksi warnanya. Selanjutnya pada pemeriksaan kromatografi lapis tipis satu atau dua dimensi sebelum dan sesudah hidrolisis senyawa-senyawa tersebut

dapat diidentifikasi dengan cara membandingkan kromatogram dan spektrum dari senyawa lain yang telah diketahui (Markham, 1988).

### **3. Peranan Flavonoid**

Flavonoid telah digunakan sebagai antiinflamasi, antioksidan, antialergi, melindungi dari kerusakan hati, antiviral, dan efektif sebagai antikanker. Flavonoid mengandung senyawa fenolik sehingga efektif sebagai pengkhelat dan penghambat radikal bebas. Flavonoid efektif sebagai antioksidan melalui pemutusan rantai pembentukan radikal bebas (Ebadi, 2001).

### **4. Kelarutan Flavonoid**

Aglikon flavonoid adalah polifenol dan karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa, karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, flavonoid merupakan senyawa polar dan umumnya flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

## **C. Radikal Bebas**

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah istilah yang digunakan untuk radikal bebas turunan oksigen (superoksida, radikal hidroksil, nitrat

oksida) dan turunan oksigen non-radikal dengan reaktivitas tinggi (oksigen tunggal, hidrogen peroksida, peroksinitrit, hipoklorit). ROS dapat berbahaya atau bermanfaat bagi tubuh. Ketidakseimbangan antara pembentukan dan hilangnya radikal bebas dapat menyebabkan kondisi patologis yang disebut sebagai stres oksidatif. Namun, tubuh manusia menggunakan molekul yang dikenal sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas ini. Tetapi beberapa penelitian belakangan menunjukkan bahwa antioksidan juga dapat memiliki efek buruk pada kesehatan manusia tergantung pada dosis dan bioavailabilitas. Hal ini penting untuk dianalisis sejauh mana kegunaan antioksidan dalam peningkatan kesehatan manusia. Perlu dicatat bahwa jika peningkatan radikal bebas melebihi efek perlindungan antioksidan, hal ini dapat menyebabkan kerusakan oksidatif yang terakumulasi selama siklus kehidupan, dan ini berpengaruh terhadap penuaan dan penyakit yang tergantung pada usia seperti penyakit kardiovaskular, kanker, gangguan neurodegeneratif, dan kondisi kronis lainnya (Bhattacharya, 2015).

#### **D. Antioksidan**

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan karena mampu menangkap molekul radikal bebas sehingga menghambat reaksi oksidatif dalam tubuh yang merupakan penyebab berbagai penyakit (Adawiah dkk., 2015).

Dalam sistem biologis, tubuh biasanya dapat memproduksi sendiri antioksidan yang berupa enzim seperti superoksida dismutase, katalase,

dan glutathion peroksidase (antioksidan endogen). Terjadi stres oksidatif karena produksi ROS berlebih maka antioksidan endogen ini harus mendapat tambahan antioksidan dari luar tubuh (antioksidan eksogen) yang dapat berasal dari asupan makanan dan minuman yang dikonsumsi (Oka, 2016).

Mekanisme hambatan dari antioksidan biasanya terjadi pada saat reaksi-reaksi inisiasi atau propagasi pada reaksi oksidasi lemak atau molekul lainnya di dalam tubuh dengan cara menyerap dan menetralkan radikal bebas atau mendekomposisi peroksida (Zheng dan Wang, 2009).

Kulit memiliki jaringan perlindungan antioksidan. Antioksidan ini termasuk antioksidan enzimatik endogen seperti GSH peroksidase (GPx), SOD, dan katalase dan antioksidan non enzimatik dengan berat molekul rendah seperti isoform vitamin E, vitamin C, asam urat, dan ubiquinol (Shindo 1993 dalam Pandel dkk., 2013).

Penelitian Shindo dkk., (1993) menunjukkan bahwa paparan radiasi kronik dan akut menyebabkan hilangnya atau menurunnya ekspresi antioksidan enzim dan meningkatkan protein modifikasi oksidatif. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian McArdle dkk., (2002) bahwa sinar UV mempengaruhi antioksidan pada kulit, dimana antioksidan askorbat, glutathion (GSH), SOD, katalase, dan ubiquinol menjadi berkurang pada semua lapisan kulit yang terpapar UV.

Antioksidan alami yang berasal dari bahan alam telah banyak diteliti manfaatnya terhadap kulit khususnya untuk antifotoaging, diantaranya Fitri

dkk., (2016) meneliti tentang efek *Mangosteen* terhadap kolagen dari mencit yang dipapar UVB. Khairi dkk., (2019) menguji efek dari krim ekstrak Klika Faloak terhadap ekspresi MMP-1 dan kolagen, hasilnya bahwa krim ekstrak mampu menurunkan ekspresi MMP-1 dan meningkatkan kerapatan dan densitas kolagen.

## **E. Ekstraksi**

### **1. Ekstrak dan Ekstraksi**

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dibuat dengan menyari atau mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani dengan pelarut yang sesuai dan menurut cara yang cocok, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditentukan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat dipisahkan secara destilasi dengan menggunakan tekanan, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Ditjen POM, 1979) (Ditjen POM, 1995).

Penyarian adalah peristiwa pemindahan massa. Zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut (Ditjen POM, 1996). Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen-komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan atau

hewan dengan pelarut tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif ke luar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses ekstraksi dapat dipisahkan menjadi pembuatan serbuk, pembasahan, ekstraksi dan pemekatan (Ditjen POM, 1996).

## **2. Metode Ekstraksi (Sarker dkk., 2006)**

Pilihan prosedur ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih metode, perlu untuk menetapkan tujuan ekstraksi. Mungkin ada sejumlah tujuan beberapa yaitu :

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui.
2. Senyawa diketahui ada pada organisme tersebut.
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang terkait secara struktural.
4. Semua metabolit sekunder yang dihasilkan oleh satu sumber alam yang tidak diproduksi oleh sumber kontrol yang berbeda, misalnya dua spesies dari genus yang sama atau spesies yang sama tumbuh di bawah kondisi yang berbeda.

5. Identifikasi semua metabolit sekunder yang ada dalam suatu organisme untuk sidik jari kimia atau studi metabolomik yang akan diisolasi. Sebelum memilih metode, perlu untuk menetapkan target ekstraksi.

Proses ekstraksi terutama untuk bahan tanaman mencakup langkah-langkah berikut:

1. Pengeringan dan penggilingan bahan tanaman atau homogenkan semua bagian tanaman segar (daun, bunga, dan lain-lain) atau maserasi keseluruhan bagian tanaman dengan pelarut.
2. Pilihan pelarut : a. Ekstraksi polar : air, etanol, metanol (MeOH), dan sebagainya. b. Ekstraksi polaritas sedang : etil asetat (EtOAc), diklorometana (DCM), dan sebagainya. c. Nonpolar : n-heksan, eter, kloroform (CHCl<sub>3</sub>), dan sebagainya.

Pilihan metode ekstraksi yaitu :

1. Maserasi
  2. *Boiling*
  3. Soxhlet
  4. Ekstraksi cairan superkritis
  5. Sublimasi
  6. Destilasi uap
1. Maserasi

Prosedur ini sederhana, tetapi masih banyak digunakan, dengan membiarkan bubuk/serbuk tanaman bubuk terendam

dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini cocok untuk ekstraksi awal dan jumlah besar. Pengadukan sesekali atau konstan pada penyiapan (menggunakan pengaduk mekanis atau mixer untuk menjamin pencampuran yang homogen) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Ekstraksi akhirnya berhenti ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman.

Kerugian utama dari maserasi adalah prosesnya bisa sangat memakan waktu, dari beberapa jam hingga beberapa minggu. Di sisi lain, karena ekstraksi dilakukan pada suhu kamar, maserasi kurang menyebabkan degradasi metabolit yang termolabil.

## 2. Perkolasi

Dalam perkolasi, bahan tanaman bubuk awalnya direndam dalam pelarut dalam perkolator (wadah silinder atau kerucut dengan keran di bagian bawah). Suhu yang lebih tinggi akan meningkatkan ekstraksi tetapi dapat menyebabkan dekomposisi metabolit yang termolabil. Kelemahan lain dari perkolasi adalah bahwa diperlukan pelarut dalam volume besar dan prosesnya bisa memakan waktu. Jika bahan tidak didistribusikan secara homogen dalam wadah (misalnya jika dikemas terlalu padat), pelarut

mungkin tidak mencapai semua area dan ekstraksi tidak akan sempurna.

### 3. Soxhlet

Ekstraksi soxhlet digunakan secara luas dalam ekstraksi metabolit tanaman karena kemudahannya. Metode ini memadai untuk ekstraksi kecil dan jumlah besar. Keuntungan utama dari metode ini adalah prosesnya yang berkelanjutan. Pelarut (jenuh dalam metabolit terlarut) masuk ke dalam *flask*, pelarut terkondensasi dan mengekstraksi bahan terus menerus. Namun, kerugian utama dari ekstraksi soxhlet adalah bahwa ekstrak terus dipanaskan pada titik didih pelarut yang digunakan, dan ini dapat merusak senyawa termolabil.

## F. Kulit

Kulit merupakan lapisan terluar tubuh yang berfungsi untuk melindungi tubuh dari pengaruh luar yang berupa mikroorganisme, penarikan atau kehilangan cairan, dan dari zat iritan kimia maupun mekanik (Syaifuddin, 2006) (Sloane, 2004).

Secara umum, anatomi kulit dapat dibagi menjadi tiga bagian besar, yaitu : (Sloane, 2004) (Porth, 2003) (Feneis, 2000) (Djuanda, 1999)

### 1. Epidermis

Merupakan lapisan terluar dari kulit. Tersusun atas jaringan epitel skuamosa bertingkat, tidak memiliki pembuluh darah, dan sel-

selya sangat rapat. Pada lapisan epidermis juga dihasilkan keratin yang berperan besar dalam mekanisme perlindungan oleh kulit. Bagian epidermis yang paling tebal dapat ditemukan pada telapak tangan dan kaki, yang mengalami stratifikasi menjadi lima lapisan berikut :

- a. Stratum korneum, adalah lapisan epidermis teratas yang terdiri atas lapisan sisik tidak hidup yang terkeratinasi yang senantiasa mengalami proses pergantian ulang yang konstan. Memiliki lapisan paling tebal dibandingkan lapisan-lapisan lain pada epidermis. Ketebalannya bervariasi mulai 15 lapisan pada daerah seperti wajah, 25 lapisan pada daerah lengan, bahkan dapat mencapai 100 lapisan atau lebih pada daerah seperti telapak tangan atau kaki.
- b. Stratum lusidum, adalah lapisan jernih dan tembus cahaya dengan sel berbentuk gepeng yang tidak bernukleus dengan ketebalan empat sampai dengan tujuh lapisan sel.
- c. Stratum granulosum, terdiri atas tiga atau lima lapisan sel, yang mengandung granul-granul protein yang disebut keratohialin, yang merupakan prekursor dari keratin.
- d. Stratum spinosum, terdiri atas dua sampai empat lapisan sel yang dinamakan sel spina atau sel tanduk karena disatukan oleh tonjolan yang menyerupai spina atau tanduk.
- e. Stratum basalis (germanitivum) adalah lapisan tunggal sel-sel yang melekat pada jaringan ikat dari lapisan kulit di bawahnya, yakni dermis. Pembelahan sel berlangsung secara cepat pada lapisan ini dan sel baru didorong masuk ke lapisan berikutnya.

## 2. Dermis

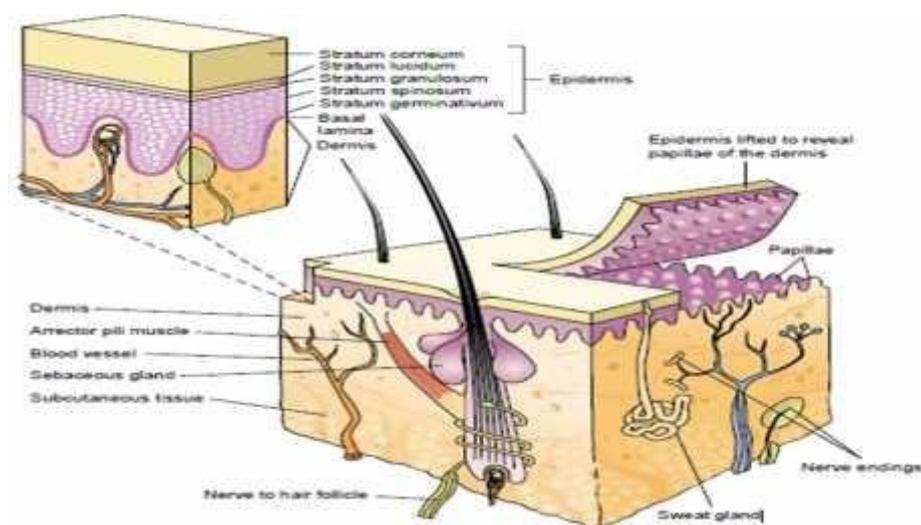
Merupakan lapisan yang menjadi penghubung antara epidermis dengan lapisan subkutaneus. Lapisan ini menyokong epidermis dengan berperan sebagai penyalur nutrisi bagi lapisan tersebut.

Dermis tersusun atas dua jaringan ikat, yaitu :

- a. Lapisan papilar, adalah jaringan ikat areolar renggang dengan fibroblas, sel mast, dan makrofag. Lapisan ini mengandung banyak pembuluh darah yang memberi nutrisi pada epidermis di atasnya.
- b. Lapisan retikular, terletak lebih dalam dari lapisan papilar. Lapisan ini tersusun atas jaringan ikat ireguler yang rapat, kolagen, dan serat elastik. Sejalan dengan penambahan usia, deteriorasi normal pada simpul kolagen dan serat elastik mengakibatkan pengeriputan kulit.

## 3. Lapisan subkutaneus

Tersusun atas jaringan yang longgar yang terdiri atas lemak, berisi banyak pembuluh darah dan ujung saraf. Jumlah sel lemak sangat beragam, tergantung pada area tubuh dan nutrisi individu.



Gambar 3. Tiga dimensi anatomi kulit (Porth, dkk., 2003)

## G. Penuaan Kulit

Penuaan kulit merupakan hal yang kompleks, melibatkan proses multifaktor dimana kulit bisa mengalami penuaan intrinsik (faktor usia, genetik, hormon) dan penuaan ekstrinsik (paparan radiasi sinar UV, polutan). Faktor luar yaitu penuaan akibat paparan sinar UV, dikenal dengan **fotoaging** (Jenkins, 2002; Lorencini dkk., 2014; Sanches dkk., 2014).

Penuaan intrinsik adalah kejadian alami dimana sejumlah mekanisme simultan terjadi. Produksi kolagen dan elastin menurun; kolagen dan elastin ini adalah serat yang membentuk matriks pada dermis dan memberikan kemampuan pada kulit untuk kembali ke bentuk semula. Seiring bertambahnya usia, kemampuan kulit untuk kembali ke bentuk semula menjadi berkurang. Pergantian sel kulit melambat sehingga tersisa sel kulit mati pada permukaan kulit. Kulit menjadi lebih tipis, penekanan antara penghubung dermis dan epidermis dan struktur dermis mulai terganggu. Hasil visual dari penuaan intrinsik adalah : (Dayan, 2008)

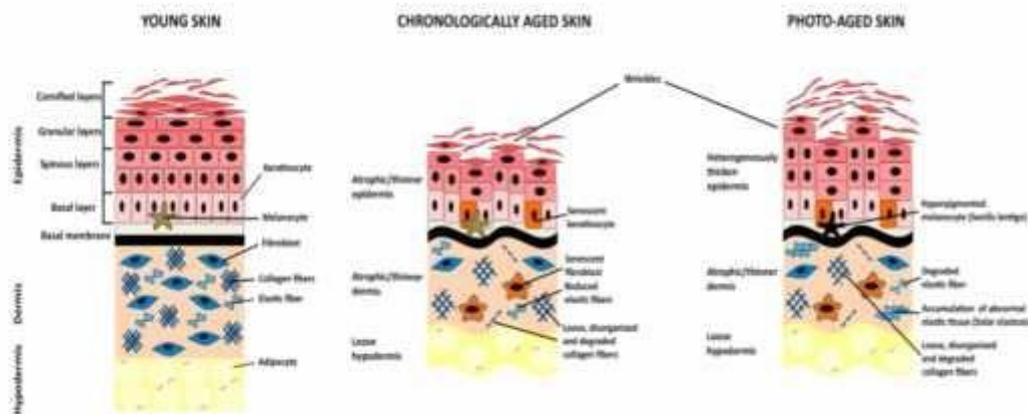
- Kulit kering/licin
- Garis halus
- Keriput
- Kulit kendur

Penuaan ekstrinsik atau fotoaging disebabkan oleh faktor-faktor luar seperti asap rokok, asap kendaraan dan polusi, tetapi penyebab paling umum adalah paparan berlebih dari radiasi UV. Paparan sinar matahari yang terus-menerus tidak hanya menghambat kemampuan kulit untuk memperbaiki kulit itu sendiri tetapi juga terus memecah dan memperlambat sintesis kolagen yang baru. Radiasi UV juga dapat

menyebabkan degradasi serat elastin yang menyebabkan penurunan yang lebih cepat pada fleksibilitas kulit. Hasil penuaan ekstrinsik dapat terlihat : (Dayan, 2008)

- Hiperpigmentasi
- Penampilan kasar
- Kulit kering
- Keriput yang dalam

Fotoaging dimediasi oleh absorpsi UV langsung dan ROS dimediasi reaksi fotokimia. Fotoaging melibatkan perubahan kompleks terhadap beberapa komponen struktur yang penting pada matriks dermal ekstraseluler yaitu kolagen, elastin, proteoglikan, dan glikoaminoglikan (Lavker, 1995; Yaar dan Gilchrest, 2001).



Gambar 4. Morfologi kulit muda, kulit dengan penuaan intrinsik (*chronologically aged skin*) dan ekstrinsik (*photo-aged skin*). Kulit manusia terbentuk oleh tiga lapisan jaringan: epidermis, dermis, dan hipodermis. Epidermis adalah epitel berlapis yang terdiri atas keratinosit yang terdiri menjadi empat lapisan utama (lapisan basal, spinosus, granular, dan korneum) pada tahap diferensiasi progresif termasuk melanosit. Dermis terdiri dari fibroblast yang berada dalam matriks ekstraseluler yang terbuat dari kolagen, serat elastis, glikoprotein, dan proteoglikan. Fibroblast adalah produsen utama komponen matriks ekstraseluler. Hipodermis terutama terdiri dari adiposit. Perubahan morfologis yang terjadi seiring terjadi pada penuaan ditunjukkan pada kulit yang menua secara intrinsik dan ekstrinsik (Orioli and Dellambra, 2018)

## H. Krim

### 1. Defenisi Krim

Krim (*cremores*) adalah sediaan setengah padat, mengandung satu atau lebih bahan terlarut atau terdispersi, berupa emulsi yang mengandung cairan berminyak yang terdispersi dalam air atau sebaliknya yang tidak stabil secara termodinamika serta dimaksudkan untuk pemakaian luar (Ditjen POM, 1995; Ansel, 1989).

### 2. Stabilitas Sediaan

Stabilitas didefenisikan sebagai kemampuan suatu produk obat atau kosmetik untuk bertahan dalam batas spesifikasi yang diterapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan untuk menjamin identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurnian produk (sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat) (Harmita, 2006; Djajadisastra, 2004).

Sebelum penyimpanan, kestabilan emulsi dipengaruhi oleh suhu dan waktu. Bentuk ketidakstabilan emulsi selama penyimpanan ditunjukkan dengan terjadinya kriming, perubahan viskositas, perubahan ukuran tetes terdispersi serta inversi fase (Alfonso, 2000).

#### a. Kriming

Kriming adalah naik atau turunnya tetes terdispersi membentuk suatu lapisan pada permukaan atau dasar dari suatu emulsi. Kriming terjadi karena pengaruh gravitasi bumi dan naik atau turunnya tetesan tergantung pada densitas kedua fase. Bila

kriming terjadi tanpa penggabungan, maka emulsi dapat diemulsikan kembali dengan pengocokan.

Persamaan Stokes sangat berguna untuk memahami proses kringing. Persamaan ini berdasarkan pada partikel yang berbentuk bola yang berukuran sama dan dipisahkan oleh jarak yang menyebabkan gerakan partikel yang satu tidak tergantung pada partikel lain. Persamaan ini memperlihatkan fungsi dari tetesan kuadrat. Jadi partikel yang lebih besar akan lebih cepat mengalami kringing dari pada partikel yang lebih kecil. Persamaan stokes juga menunjukkan bahwa kecepatan kringing berbanding terbalik dengan kekentalan.

**b. Viskositas**

Viskositas emulsi merupakan kriteria yang penting untuk mempelajari kestabilan emulsi dan tidak berhubungan dengan viskositas absolut tetapi dengan perubahan viskositas pada berbagai periode waktu.

Tetesan-tetesan pada emulsi yang baru dapat bergabung dengan segera dan menunjukkan peningkatan viskositas. Setelah perubahan ini kebanyakan emulsi menunjukkan perubahan viskositas yang berhubungan dengan waktu. Jika viskositas tidak berubah dengan waktu maka emulsi dianggap ideal. Meskipun kebanyakan sistem masih dapat diterima kestabilannya bila menunjukkan sedikit kenaikan viskositas dalam waktu antara 0,04

dan 400 hari. Kebanyakan emulsi mengalami penurunan viskositas pada suhu tinggi dan mengalami kenaikan viskositas bila ditempatkan pada suhu kamar.

**c. Perubahan ukuran tetes terdispersi**

Perubahan rata-rata ukuran tetes terdispersi untuk distribusi ukuran tetes terdispersi merupakan parameter yang penting untuk mengevaluasi suatu emulsi. Analisis ukuran tetes terdispersi dapat dilakukan dengan beberapa metode. Salah satunya adalah pengukuran diameter tetes terdispersi dengan mikroskop yang memberikan nilai rata-rata tergantung pada jumlah tetes untuk setiap ukuran.

**d. Inversi fase**

Suatu emulsi dikatakan mengalami inversi fase ketika terjadi perubahan tipe emulsi dari M/A (minyak dalam air) ke A/M (air dalam minyak) atau sebaliknya. Inversi kadang-kadang terjadi dengan penambahan elektrolit atau dengan mengubah rasio volume fase. Inversi fase dapat dilihat ketika emulsi disiapkan dengan pemanasan dan pencampuran 2 fase kemudian didinginkan. Hal ini terjadi karena adanya daya larut bahan pengemulsi tergantung pada perubahan temperatur.

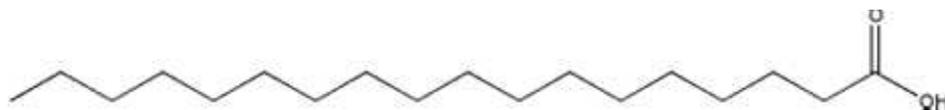
Untuk memperoleh nilai kestabilan suatu sediaan farmasetika atau kosmetik dalam waktu yang singkat maka dapat dilakukan uji stabilitas dipercepat. Pengujian ini dimaksudkan untuk

mendapatkan informasi yang diinginkan pada waktu sesingkat mungkin dengan cara menyimpan sampel pada kondisi yang dirancang untuk mempercepat terjadinya perubahan yang biasanya terjadi pada kondisi normal (Harmita, 2006).

### 3. Uraian Bahan Tambahan (Rowe, *dkk.*, 2009)

Berikut adalah bahan tambahan yang digunakan dalam pembuatan krim untuk penelitian ini :

#### a. Asam Stearat

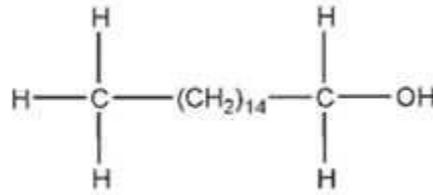


Rumus molekul :  $C_{18}H_{36}O_2$ , Berat molekul : 284,47

Gambar 5. Rumus struktur asam stearat

Asam stearat berupa zat padat keras mengkilap menunjukkan susunan hablur, kuning pucat atau putih, mirip lemak lilin. Praktis tidak larut dalam air, larut dalam 20 bagian etanol (95%) P, dalam 2 bagian kloroform P dan dalam 3 bagian eter P. Memiliki titik lebur tidak kurang dari  $54^{\circ}C$ . Asam stearat adalah bahan yang stabil, perlu diberi tambahan antioksidan. Asam stearat digunakan sebagai emolien dalam kosmetika, sebagai emulgator dalam sediaan krim bila sebagian dinetralkan dengan basa atau trietanolamin, pematik.

### b. Setil Alkohol

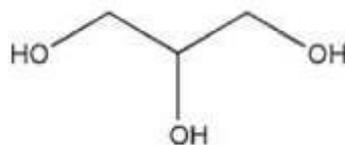


Rumus molekul :  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}$ , Berat molekul : 242,44

Gambar 6. Rumus struktur setil alkohol

Setil alkohol berupa serpihan putih, berbentuk kubus atau granul dengan bau khas yang lemah. Setil alkohol praktis tidak larut dalam air, mudah atau sedikit larut dalam alkohol, larut dalam eter, bercampur bila dilebur bersama minyak hewani atau nabati, paraffin cair dan lemak bulu domba cair. Memiliki titik lebur  $45^{\circ}$ - $52^{\circ}\text{C}$ . Setil alkohol digunakan sebagai emolien, stabil terhadap asam, basa, cahaya dan udara serta tidak menjadi tengik. Konsentrasi sebagai emolien 2 – 5%.

### c. Gliserin



Gambar 7. Rumus struktur gliserin

Gliserin berupa cairan bersih, tidak berwarna, tidak berbau, kental, higroskopis, memiliki rasa manis, sekitar 0,6 kali sukrosa. Gliserin sukar larut dalam aseton, praktis tidak larut dalam benzen, kloroform, dan minyak, larut dalam air, metanol, dan etanol 95%. Memiliki titik lebur  $17,8^{\circ}\text{C}$ . Campuran gliserin dengan

air, etanol (95%), dan propilen glikol membentuk campuran yang stabil. Gliserin terutama digunakan sebagai humektan dan emolien. Gliserin juga digunakan sebagai pelarut atau kosolven dalam krim dan emulsi.

#### d. Fenoksietanol

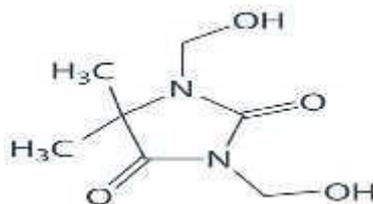


Rumus molekul :  $C_8 H_{10} O_2$  , Berat molekul : 138,16

Gambar 8. Rumus struktur fenoksietanol

Fenoksietanol ( $C_8 H_{10} O_2$ ) diperoleh dengan mencampur fenol dengan etilen oksida ke dalam media alkali. Pada suhu ruang fenoksietanol berbentuk cairan berminyak berwarna bening dengan bau aromatik yang lemah. Fenoksietanol memiliki titik didih  $245,2^{\circ}C$  pada tekanan atmosfer 760 mmHg dan titik leleh  $14^{\circ}C$ . Fenoksietanol larut dalam air, eter, dan natrium hidroksida. Konsentrasi yang biasa digunakan pada sediaan topikal adalah 0,25 – 1% (Pubchem, 2005).

#### e. DMDM

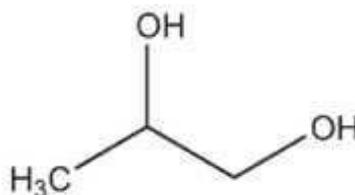


Rumus molekul :  $C_7H_{12}N_2O_4$ , Berat molekul : 188,183

Gambar 9. Rumus struktur DMDM Hydantoin

Memiliki sinonim DMDM Hydantoin, 1,3-Bis(hydroxymethyl)-5,5 dimethylimidazolidine-2,4-dione, Dmdmh, Glydant, Dimethyloldimethyl hydantoin, 1,3-Dimethylol-5,5-dimethylhydantoin, Glycoserve-DMDMH, Dantoin dmdmh 55. Dengan rumus molekul  $C_7H_{12}N_2O_4$  dengan berat molekul 188,183 g/mol. DMDM hydantoin adalah *formaldehyde releaser* pengawet antimikroba dengan nama dagang Glydant. DMDM hydantoin merupakan senyawa organik yang termasuk kelas senyawa yang dikenal sebagai hydantoins. Hal ini digunakan dalam industri kosmetik dan ditemukan dalam produk seperti shampoo, kondisioner rambut, gel rambut, Rite Aid Liquid Pelumas, dan produk perawatan kulit. DMDM hydantoin bekerja sebagai pengawet karena formaldehida dirilis membuat lingkungan yang kurang menguntungkan bagi mikroorganisme (Pubchem, 2004).

#### f. Propilenglikol



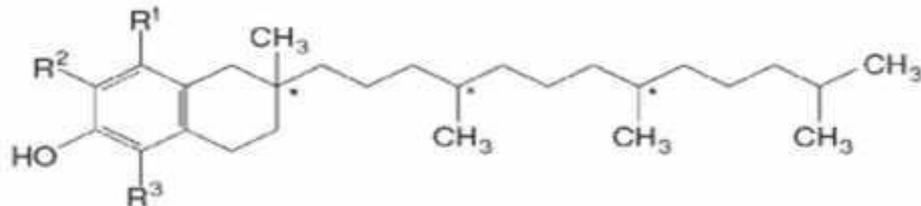
Rumus molekul :  $C_3H_8O_2$ , Berat molekul : 76.09

Gambar 10. Rumus struktur propilenglikol

Propilenglikol berupa cairan kental yang jernih, tidak berwarna, praktis tidak berbau dengan sedikit rasa manis

menyerupai gliserin. Propilenglikol digunakan sebagai humektan dalam sediaan kosmetik dengan konsentrasi hingga 15%.

#### g. Alfa Tokoferol



Rumus molekul :  $C_{29}H_{50}O_2$ , Berat molekul : 430.72

Gambar 11. Rumus struktur alfa tokoferol

Berupa cairan seperti minyak, kuning jernih, tidak berbau atau sedikit berbau. Praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol (95%) P dan dapat bercampur dengan eter P dengan aseton P, dengan minyak nabati dan dengan kloroform P. Tidak stabil terhadap cahaya dan udara. Tokoferol digunakan sebagai antioksidan dalam sediaan kosmetik.

#### h. Parafin Cair

Parafin cair (minyak mineral) dapat berfungsi sebagai emolien, pelarut dan digunakan sebagai fase minyak pada sediaan emulsi minyak dalam air. Parafin cair tergolong aman sehingga digunakan secara luas pada berbagai sediaan topikal. Minyak mineral ini bersifat transparan, tidak berasa, tidak berbau saat dingin dan berbau petroleum ketika dipanaskan. Parafin cair praktis tidak larut dalam etanol 95%, gliserin, dan air. Tetapi, larut dalam

aseton, benzen, kloroform, eter dan petroleum eter. Konsentrasi yang biasa digunakan untuk sediaan topikal adalah 1 – 32%.

**i. Viskolam<sup>®</sup>** (Farlex, 2004)

Viscolam<sup>®</sup> mengandung *sodium polyacrylatdimetyl taurate*, *hidrogenated polidecene*, dan *trideceth-10* yang dapat digunakan sebagai penstabil emulsi dan menstabilkan beberapa formulasi perawatan kulit. Konsentrasi penggunaan 1 – 3%.

**j. Aquadest** (Ditjen POM, 1979)

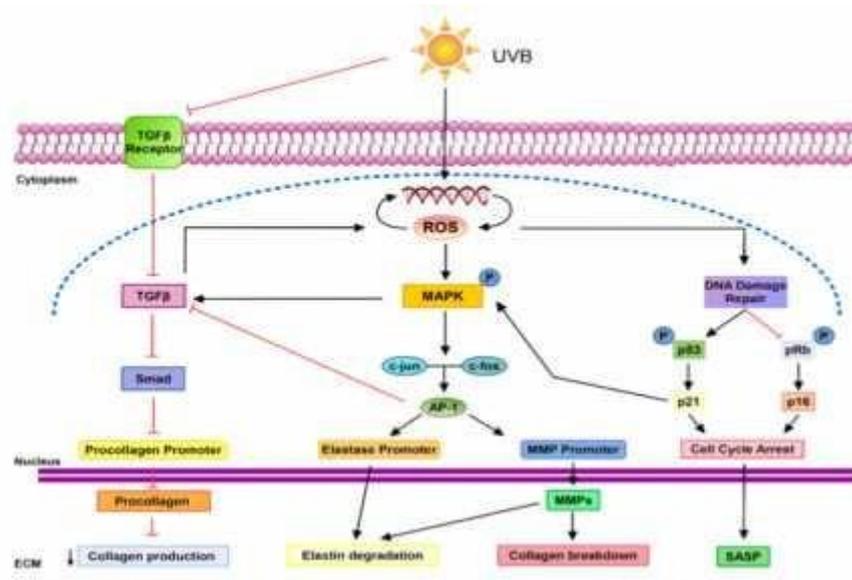
Aqua destilata atau air suling berfungsi sebagai pelarut. Aqua destilata merupakan air yang dibuat dengan menyuling air minum dan dapat diminum. Aqua destilata berupa cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau, dan tidak mempunyai rasa.

## **I. Sinar Ultraviolet-B (UVB)**

Sinar UV dapat diklasifikasikan berdasarkan panjang gelombangnya, UVC (200 – 280 nm), UVB (280 – 320), dan UV A (320 – 400 nm). UVC tertahan oleh lapisan ozon, UVA dan UVB berpenetrasi hingga ke permukaan bumi dan mempercepat penuaan kulit (Afaq dan Mukhtar, 2006). Radiasi sinar UV menginduksi pembentukan ROS (Reactive Oxygen Species) dan kerusakan DNA, kanker kulit, menyebabkan peningkatan produksi dari MMP (metalloproteinase), dimana MMP bertanggung jawab terhadap degradasi protein pada matriks ekstraselular seperti kolagen, fibronektin, elastin, proteoglikan yang

berkontribusi terhadap fotoaging (Kim and Park, 2016; Pittayapruek dkk., 2016), dan mendorong penurunan ekspresi Transforming Growth Factor-Beta (TGF Beta), yaitu suatu sitokin yang merangsang produksi kolagen (Choi, dkk., 2007 ; Tanaka, dkk., 2008).

UVB (290 hingga 320 nm) mempengaruhi lapisan superfisial pada kulit (epidermis) dan menyebabkan *sunburn*. UVB ini sangat intens pada jam 10 pagi dan 2 siang, selama musim panas, tidak berpenetrasi melalui kaca, dan sekitar 70% rata-rata akumulasi dosis per orang per tahun (Laurent-Applegate and Schwarzkopf, 2001).



Gambar 12. Jalur *signaling* utama yang terlibat dalam proses penuaan kulit yang diinduksi oleh UVB. Iradiasi UVB berperan pada beberapa *signaling pathway* yang mengontrol perkembangan siklus sel dan regulasi transkripsi gen yang terlibat dalam sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler. Aktivasi atau pemblokiran jalur ini menyebabkan siklus sel terhenti dan merusak fungsi utama sel matrik ekstraseluler pada efek terbesar terjadinya fotoaging (Cavinato and Durr, 2017)

## J. Metalloproteinase (MMP) dan MMP-1

Metalloproteinase (MMP) merupakan famili dari zinc-dependent metalloendopeptidase yang mampu mendegradasi atau memecah beberapa bagian dari matriks ekstraselular, serta berbagai macam protein ekstraselular, baik pada proses normal dan penyakit (Wells dkk., 2015). MMP diklasifikasikan yaitu kollagenase, gelatinase, stromelisin, dan jenis membran mengikuti spesifitas dan tergantung dimana enzim tersebut disekresikan sebagai protein yang larut atau terikat pada membran permukaan sel (Fu, 2018). Terdapat kurang lebih 28 tipe dari MMP yang telah diidentifikasi mempunyai peranan penting dalam beberapa proses patofisiologi termasuk fotoaging, penyembuhan luka, re-modeling dan pertumbuhan skeletal, arthritis, inflamasi, angiogenesis, dan kanker (Quan, 2009; Jung, 2010; Sbardella, 2012).

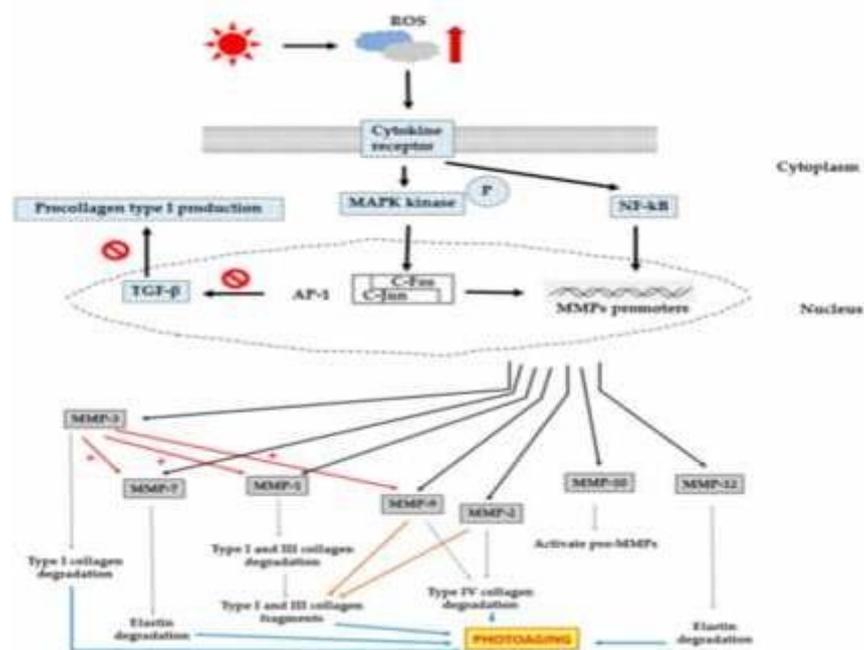
MMP dapat diklasifikasikan menjadi 5 kelompok utama berdasarkan spesifitas substrat dan pengelompokan struktur :

1. Kollagenase (MMP-1, MMP-8, dan MMP-13) mengenali substrat melalui hemopexin-like domain dan mampu untuk mendegradasi kollagen fibril, khususnya kollagen tipe I dan III untuk MMP-1.
2. Gelatinase (MMP-2 dan MMP-9) mampu untuk mencerna sejumlah komponen ECM seperti kollagen tipe IV.
3. Stromelisin (MMP-3, MMP-10, dan MMP-11) memiliki susunan yang sama dengan kollagenase, tetapi tidak dapat memecah kollagen fibril tipe I.

4. Matrilisin (MMP-7 dan MMP-26) mampu mendegradasi kolagen tipe IV dan elastin.
5. Jenis-Membran (MMP-14, MMP-15, dan MMP-16).

Sebagai tambahan 5 kelompok MMP di atas, terdapat beberapa MMP yang tidak dikelompokkan dalam kelompok tersebut, seperti metalloelastase (MMP-12), RASI-1 (MMP-19), enamelisin (MMP-20) dan epilisin (MMP-28) (Sbardella dkk., 2012).

Pada kulit manusia, keratinosit epidermis dan fibroblast dermis utamanya mengeluarkan MMP-1 (kolagenase interstitial atau kolagenase 1), merupakan kolagenase yang mendegradasi kolagen fibril tipe I dan III menjadi fragmen/bagian spesifik pada bagian tunggal dalam *central triple helix* (Pittayapruek dkk., 2016). Peranan MMP dalam fotoaging dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Diagram skema menunjukkan peranan MMP pada fotoaging. UV menginduksi peningkatan produksi ROS intraselular yang mengaktifasi mitogen-activated protein kinases (MAPK) dan nuclear factor-kappa B (NF-κB), puncak pengaturan transkripsi dari MMP, menghasilkan degradasi pada kolagen dan elastin. Pada akhirnya menyebabkan fotoaging. AP-1 menghambat signal transforming growth factor (TGF-beta), menyebabkan pengurangan sintesis kolagen. (Pittayapruek dkk., 2016)

## K. TGF Beta

Jalur TGF Beta memiliki efek yang sangat beragam pada jenis sel yang berbeda karena kelompok TGF Beta yang berbeda mengaktifkan kelompok reseptor TGF Beta yang berbeda, yang mengaktifkan kelompok yang berbeda dari faktor transkripsi golongan Smad. Selain itu, akan terlihat bahwa aktivasi protein Smad yang sama dengan faktor transkripsi yang berbeda, mengaktifkan bagian gen yang berbeda, pada jenis sel yang berbeda. Famili dari TGF Beta termasuk sejumlah molekul signaling ekstraselular memiliki peranan yang besar dalam mengatur perkembangan baik invertebrata maupun vertebrata. Telah diteliti famili dari TGF Beta, TGF Beta-1, diidentifikasi berdasarkan kemampuannya untuk menginduksi fenotip tumor ganas di beberapa jalur sel kanker mamalia tahap awal yang dikultur (mengubah faktor pertumbuhan), dalam hal ini, TGF Beta-1 mendorong metastasis, penyebaran dan invasi tumor primer. Namun, fungsi utama dari ketiga isoform TGF Beta pada manusia, TGF-Beta-1, 2, dan 3, dalam sebagian besar sel mamalia normal (non-kanker) adalah untuk mencegah proliferasi sel dengan menginduksi sintesis protein, termasuk p15INK4B, yang menghambat cyclin-dependent kinases (CDK) yang berperan dalam perkembangan ke fase S pada siklus sel (Alberts dkk., 2015).

TGF Beta diproduksi oleh banyak sel dalam tubuh dan menghambat pertumbuhan antara sel yang mensekresi (autocrine signaling) dan sel tetangga (paracrine signaling). Protein TGF Beta juga meningkatkan ekspresi molekul sel dan molekul matriks ekstraseluler, yang memiliki peran penting dalam pengaturan jaringan (Alberts dkk., 2015).

TGF Beta disintesis pada ujung panjang N-terminal yang terpotong dalam kompleks golgi. Bentuk monomer dari rantai TGF Beta terdiri dari 3 ikatan disulfida intramolekul. Beberapa mekanisme, termasuk digesti protease, melepaskan bentuk TGF Beta aktif dari matriks ekstraseluler dan mengarah pada percepatan aktivasi dari pensinyalan sel, yang merupakan hal yang penting dari beberapa jalur pensinyalan (signaling pathway) (Alberts dkk., 2015).

Selain AP-1, TGF Beta merupakan sitokin yang berperan sebagai regulator utama pada produksi kolagen. Dengan adanya radiasi sinar UV akan menurunkan ekspresi TGF Beta yang menyebabkan penurunan pembentukan kolagen (Helfrich dkk, 2008; Lim, 2012)

#### **L. Kolagen (Alberts dkk., 2015)**

Kolagen adalah protein yang paling banyak pada jaringan hewan. Molekul kolagen terdiri dari tiga rantai polipeptida yang panjang, masing-masing mengandung asam amino glisin nonpolar pada setiap posisi ketiga. Struktur reguler ini memungkinkan rantai untuk berputar di sekitar satu sama lain untuk menghasilkan rantai triple helix yang panjang.

Banyak molekul kolagen kemudian saling mengikat satu sama lain dari ujung ke ujung untuk menciptakan susunan yang tumpang tindih yang panjang. Dengan demikian menghasilkan serat kolagen yang sangat kuat yang memberi kekuatan tarikan pada jaringan penghubung tersebut.

Kolagen adalah protein utama matriks ekstraseluler. Kolagen adalah famili protein berserat yang ditemukan pada semua hewan multiseluler. Kolagen disekresikan dalam jumlah besar oleh sel-sel jaringan ikat, dan dalam jumlah yang lebih kecil oleh banyak tipe sel lainnya. Sebagai

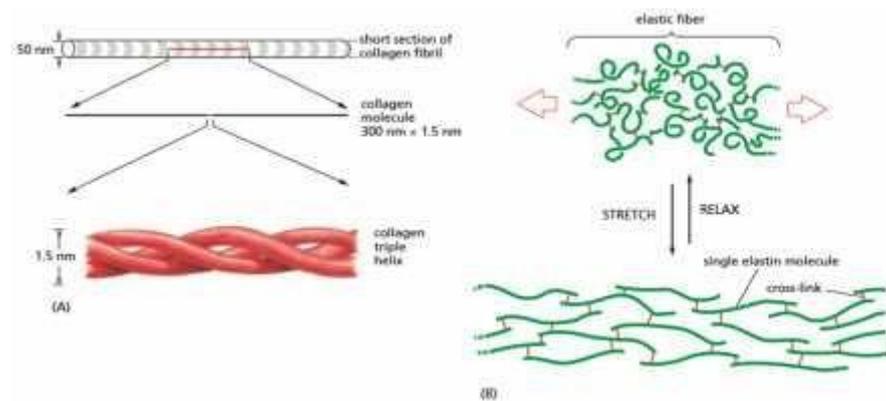
komponen utama kulit dan tulang, kolagen adalah protein yang paling banyak pada mamalia, dimana kolagen merupakan 25% dari total massa protein. Fitur utama dari molekul kolagen yang khas adalah struktur heliksnya yang panjang, kaku, beruntai rangkap tiga, dimana tiga rantai polipeptida kolagen, yang disebut rantai  $\alpha$ , dililit satu sama lain dalam superhelix mirip ikatan tali.

Kolagen sangat kaya akan prolin dan glisin, yang keduanya penting dalam pembentukan untaian tripel heliks. Genom manusia mengandung 42 gen berbeda yang mengkode rantai kolagen  $\alpha$  yang berbeda. Kombinasi yang berbeda dari gen-gen ini diekspresikan dalam jaringan yang berbeda. Meskipun pada prinsipnya ribuan jenis molekul kolagen beruntai rangkap tiga dapat dirakit dari berbagai kombinasi rantai 42  $\alpha$ , hanya sejumlah kecil kombinasi tripel heliks yang memungkinkan, dan sekitar 40 jenis molekul kolagen telah ditemukan.

Kolagen Tipe I adalah yang paling umum, menjadi kolagen utama untuk kulit dan tulang. Kolagen tipe I termasuk ke dalam kelas kolagen fibrilar, atau kolagen pembentuk fibril, setelah disekresikan ke dalam ruang ekstraseluler, kolagen ini berkumpul menjadi polimer yang lebih banyak yang disebut fibril kolagen, yang merupakan struktur tipis (berdiameter 100 – 300 nm), beberapa ratus mikrometer panjangnya pada jaringan dewasa/matang, dimana kolagen ini terlihat jelas dalam menggunakan mikrograf elektron.

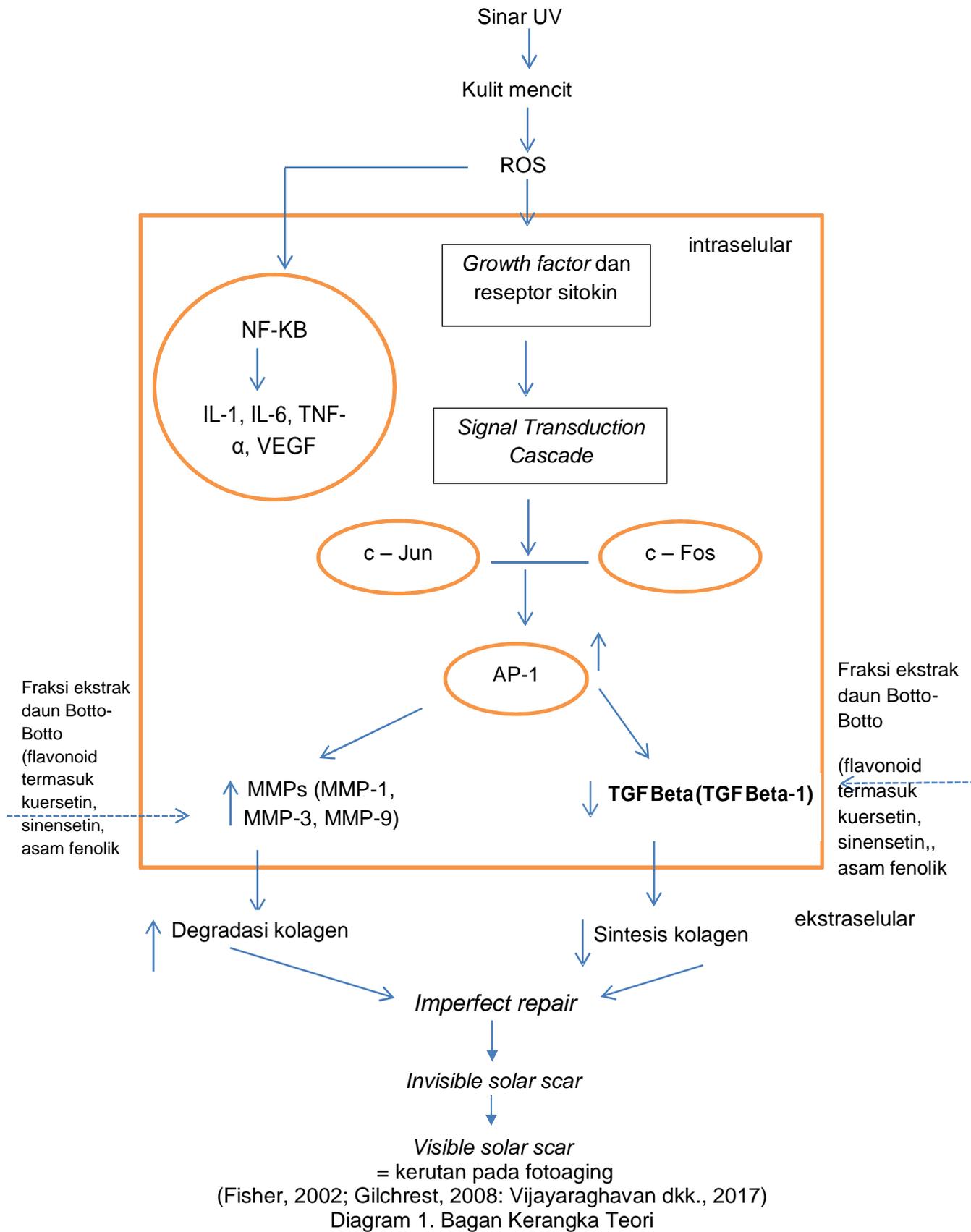
Kolagen fibril sering membentuk agregat yang lebih besar, seperti kabel, berdiameter beberapa mikrometer, dapat terlihat dengan mikroskop cahaya sebagai serat kolagen. Kolagen tipe IX dan XII disebut kumpulan kolagen fibril karena kolagen ini berada pada permukaan kolagen fibril.

Tipe ini dianggap menghubungkan fibril-fibril satu sama lain dan komponen lain dalam matriks ekstraseluler. Tipe IV adalah kolagen pembentuk jaringan, membentuk bagian utama lamina basal, sedangkan molekul tipe VII membentuk dimer yang berkumpul menjadi struktur khusus yang disebut *anchoring* fibril. *Anchoring* Fibril membantu melekatkan lamina basal pada epitel multilayer ke jaringan ikat yang mendasarinya dan oleh karena itu jumlahnya akan sangat banyak di kulit. Terdapat juga sejumlah protein "seperti kolagen" yang mengandung bagian seperti kolagen pendek. Ini termasuk kolagen tipe XVII, yang memiliki bagian trans membran dan ditemukan di hemidesmosom, dan tipe XVIII, protein inti dari proteoglikan dalam lamina basal.

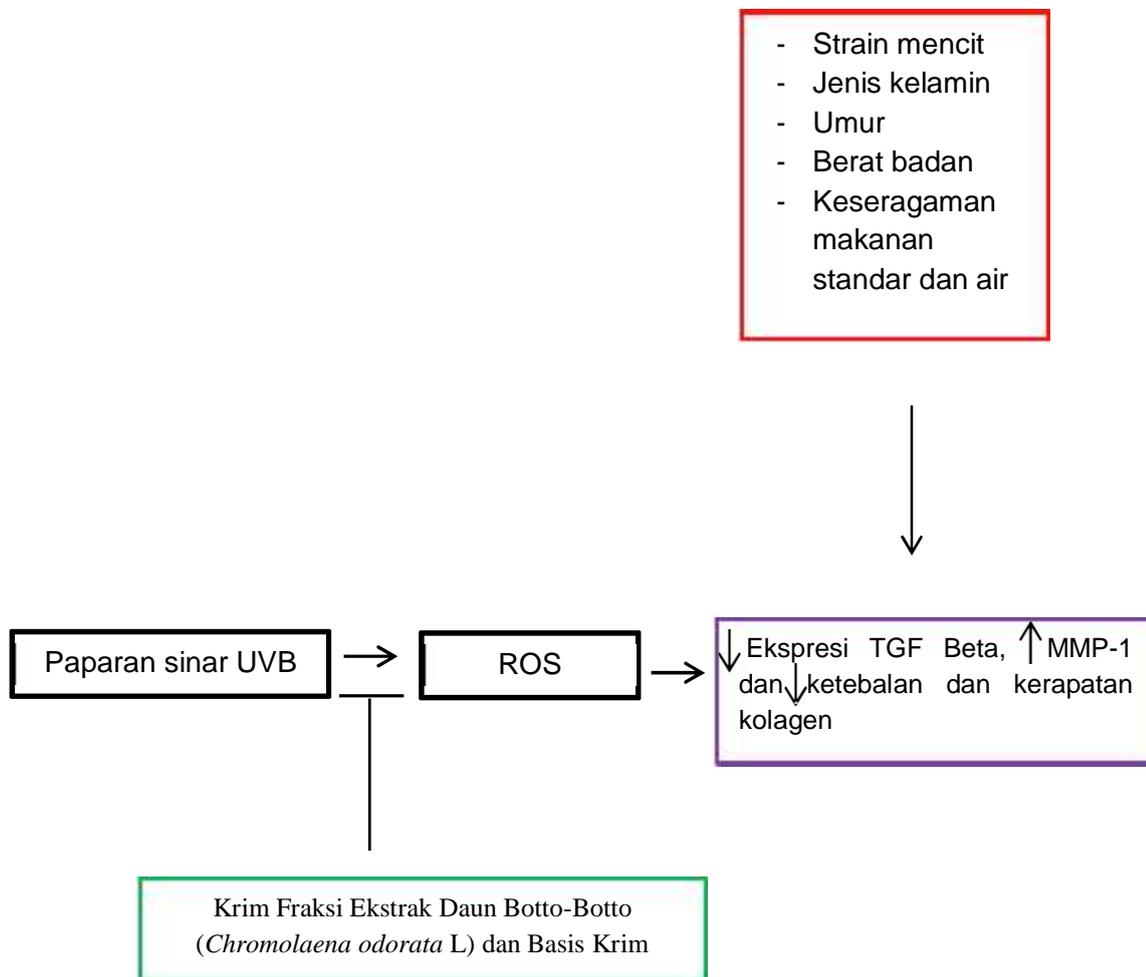


Gambar 14. Kolagen dan Elastin. (A) Kolagen adalah triple heliks dibentuk oleh perpanjangan tiga rantai protein yang menutupi sekitar salah satu bagian (bawah). Beberapa molekul kolagen *cross-linked* bersama dalam bagian ekstraseluler untuk membentuk fibril kolagen yang tak bisa diperpanjang (atas) yang memiliki kekuatan tarikan yang kuat. Striping pada fibril kolagen disebabkan oleh pengaturan berulang pada molekul kolagen terhadap fibril. (B) Rantai Elastin polipeptida ter *cross-linked* dalam bagian ekstraseluler untuk membentuk *rubberlike*, serat elastik. Tiap molekul elastin *uncoil* menjadi konformasi yang diperpanjang ketika serat ditarik dan dikembalikan secara spontan seketika gaya tarikan diiadakan. *Cross-linking* pada daerah ekstraseluler tersebut membentuk ikatan kovalen antara sisi rantai lysine, tetapi sifat kimia berbeda dengan kolagen dan elastin. (Alberts dkk, 2015)

**M. Kerangka Teori**



## N. Kerangka Konsep Penelitian



**Ket :**

- = Variabel bebas
- = Variabel tergantung
- = Variabel kendali

## O. Hipotesis Penelitian

1. Fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) memiliki aktivitas antioksidan melalui penangkapan radikal bebas (*Free Radical Scavenging*) dengan metode DPPH, FRAP dan ABTS.
2. Krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) memiliki stabilitas fisik yang baik.
3. Krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) mampu mencegah peningkatan ekspresi protein MMP-1 dan mencegah penurunan TGF Beta-1 pada mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji IHK (Immunohistokimia).
4. Krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) mampu mencegah penurunan ketebalan dan kerapatan kolagen pada kulit mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji histopatologi.
5. Krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) mampu mencegah peningkatan ekspresi mRNA MMP-1 pada mencit BALB/c yang mengalami fotoaging akibat paparan sinar UVB dengan menggunakan uji RT-PCR.
6. Krim fraksi ekstrak daun Botto-Botto (*Chromolaena odorata* L.) tidak menyebabkan iritasi.