

Krim Astaxanthin Mencegah Peningkatan Melanin Kulit Marmut (*Cavia porcellus*) yang Dipapar Sinar Ultraviolet B

Astaxanthin Cream Prevents Increased Melanin in Guinea Pig Skin Exposed by Ultraviolet Light B

Tetty Cristina Sitanggang

Program Magister Biomedik Kekhususan *Anti-Aging Medicine*, Fakultas Kedokteran,
Universitas Udayana, Denpasar, Bali
*E-mail: tetty0681@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan efek pemberian krim astaxanthin 0,02% mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut (*Cavia porcellus*) yang dipapar sinar UVB dengan efektivitas yang sama dengan krim hidrokuinon 4%. ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *post test only control group design*. Tiga puluh ekor marmut (*Cavia Porcellus*) jantan dibagi menjadi 3 kelompok dengan jumlah sampel 10 ekor tiap kelompok. Kelompok 1 yaitu kelompok kontrol, diberi paparan sinar UVB dan diolesi krim dasar. Kelompok 2 diberi paparan sinar UVB dan krim hidrokuinon 4%. Kelompok 3 diberi paparan sinar UVB dan krim astaxanthin 0,02%. Dosis total UVB yaitu 390 mJ/cm² yang diberikan selama 2 minggu. Pemeriksaan histopatologis jaringan kulit dengan pewarnaan *Masson-Fontana*. Jumlah melanin dihitung dengan persentase pixel luas area melanin dibandingkan dengan pixel seluruh jaringan epidermis. Hasil penelitian menunjukkan jumlah melanin paling tinggi terdapat pada kelompok 1 sebesar 27,55 ± 3,63%. Jumlah melanin paling rendah terdapat pada kelompok 2 sebesar 0,90 ± 0,26%, sedangkan jumlah melanin pada kelompok 3 sebesar 1,09 ± 0,40%. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dan 3 ($p < 0,05$). Perbandingan antara kelompok 2 dan 3 tidak berbeda bermakna dalam mencegah peningkatan jumlah melanin ($p > 0,05$). Simpulan: krim astaxanthin 0,02% dapat mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut yang dipapar sinar UVB dengan efektivitas yang sama dengan krim hidrokuinon 4%.

Kata kunci: krim astaxanthin, melanin, ultraviolet B, marmut.

ABSTRACT

The purpose of this research was to prove the effect of administration of 0.02% astaxanthin cream prevented the increase of skin melanin in guinea pig (*Cavia porcellus*) exposed to UVB as effective as 4% hydroquinone cream. This study was an experimental research using randomized post test only group design. A total of thirty guinea pigs (*Cavia Porcelus*) used in this study were divided into 3 groups consisted of 10 male guinea pigs in each group. Group 1 as a control group was treated by UVB exposure and basic cream. Group 2 was treated by UVB and 4% hydroquinone cream. Group 3 was treated by UVB and 0.02% astaxanthin cream. Total 390 mJ/cm² ultraviolet B dosage was given for 2 weeks. The amount of melanin was examined by histopathological method with *Masson-Fontana* staining, counting the melanin area by black color. The amount of melanin was calculated by the percentage of the pixels area of melanin and was compared with the pixels of all the epidermal tissues. The results showed that the highest number of melanin was in the group 1 (27.55 ± 3.63%). The lowest number of melanin was in group 2 (0.90 ± 0.26%). The amount of melanin in group 3 was 1.09 ± 0.40 %. There was significant difference within group 1 compared with group 2 and 3 ($p < 0.05$). There was no significant difference within group 2 compared with group 3 ($p > 0.05$). **Conclusion:** The administration of 0.02% astaxanthin cream prevented the increase of melanin in guinea pig (*Cavia porcellus*) exposed to UVB with the same effectiveness with 4%

hydroquinone cream.

Keywords: *astaxanthin cream, melanin, ultraviolet B, guinea pigs.*

PENDAHULUAN

Dalam proses kehidupan, menjadi tua adalah merupakan suatu hal yang alamiah. Semua organ tubuh mengalami proses penuaan, termasuk kulit yang banyak terpapar dengan pengaruh lingkungan. Faktor lingkungan yang sangat berperan dalam proses penuaan kulit adalah radiasi sinar ultraviolet. Paparan sinar ultraviolet yang terjadi secara terus-menerus menimbulkan perubahan dalam struktur dan fungsi kulit, mulai dari efek samping akut seperti *sunburn*, *tanning* dan hiperpigmentasi, sampai pada efek samping kronis seperti *photoaging* dan kanker kulit (Bernerd dkk., 2012; Pandel dkk., 2013).

Hiperpigmentasi adalah salah satu tanda penuaan pada kulit, yang terjadi akibat peningkatan jumlah melanin, seperti yang terjadi pada melasma. Melasma merupakan kelainan akibat proses penuaan yang paling sering dikeluhkan oleh masyarakat sehingga mengganggu tampilan fisik seseorang dan menyebabkan kurangnya percaya diri pada penderita (Lapeere dkk., 2008; Soepardiman, 2010). Pada tahun 2014, di RS Abdul Moeloek, Lampung pernah dilakukan penelitian dengan menggunakan kuesioner *Dermatology Life Quality Index (DLQI)* yang membuktikan bahwa melasma secara bermakna mempengaruhi kesejahteraan emosional penderita (Hadiyati dkk., 2014).

Melanin adalah pigmen yang menghasilkan warna pada kulit. Melanin diproduksi dalam melanosom yang dihasilkan oleh melanosit. Pembentukan melanin dapat dirangsang oleh faktor intrinsik seperti endokrin (hormonal), sistem imun, inflamasi, dan sistem saraf pusat, serta juga faktor ekstrinsik seperti radiasi UV, obat-obatan, polusi, dan asap rokok (Ichihashi dkk., 2009). Proses sintesis melanin (melanogenesis) bermula dari hidroksilasi tirosin menjadi 3,4 dihidroksiphenilalanin (DOPA) dan oksidasi DOPA menjadi dopakuinon oleh enzim tirosinase. Dopakuinon akan dipolimerisasi secara spontan membentuk melanin. Enzim tirosinase akan bekerja langsung pada saat distimulasi oleh sinar UV (Baumann dan Saghari, 2009).

Sinar UV diperlukan dalam proses pembentukan melanin, namun paparan UV yang berlebih menyebabkan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) atau radikal bebas yang meningkatkan oksidasi protein dan akumulasi peroksidasi lipid. Pada kulit manusia, level hidrogen peroksida meningkat lebih dari dua kali lipat yang mengkatalisasi reduksi molekul oksigen menjadi anion superoksida. Hidrogen peroksida dapat dengan cepat membentuk ROS lain, seperti radikal hidroksil sehingga terjadi reaksi berantai. Pada akhirnya ROS akan menyebabkan stres oksidatif pada kulit yang dapat menstimulasi pembentukan melanin secara berlebihan (Baumann dan Saghari, 2009).

Penanganan masalah hiperpigmentasi dapat secara tunggal atau kombinasi, dapat diberikan pula secara oral, topikal ataupun tindakan medis tertentu. Pengobatan secara topikal dapat dengan memberikan tabir surya, golongan *tyrosinase inhibitor* seperti hidrokuinon, golongan *retinoid*, asam azelaik, asam kojik, antioksidan dan lain-lain (Rigopoulos dkk., 2007). Pengobatan secara oral adalah dengan pemberian antioksidan, ataupun vitamin (Moertolo, 2009). Beberapa tindakan medis yang sering digunakan untuk mengatasi hiperpigmentasi adalah *chemical peeling* menggunakan *glycolic acid*, *trichloroacetic acid* (TCA), mikrodermabrasi, ataupun laser (Steiner dkk., 2009).

Sampai saat ini krim hidrokuinon masih menjadi bahan untuk pengobatan hiperpigmentasi terbaik (Baumann dan Alleman, 2009). Hidrokuinon merupakan senyawa kimia hidroksifenolik yang dapat menghambat perubahan DOPA menjadi melanin dengan menghambat kerja enzim tirosinase, merusak sel melanosit langsung, mempercepat degradasi melanosom (Rigopoulos, 2007). Hidrokuinon dapat mencegah terbentuknya melanin yang baru, dan penghambatannya bersifat *reversible* (Chandra dkk., 2011). Namun penggunaan hidrokuinon jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yaitu menimbulkan iritasi, *rebound phenomenon* dan okronosis (Baumann dan Alleman, 2009). Oleh karena itu penggunaan hidrokuinon saat

ini sudah mulai dibatasi.

Astaxanthin adalah pigmen karotenoid yang terbentuk secara alamiah pada berbagai organisme laut yang dikenal sebagai mikro alga *Haematococcus pluvialis*. Astaxanthin bekerja pada kulit manusia dengan membangun lapisan pelindung bawah kulit. Astaxanthin dikatakan menjadi antioksidan yang terbaik karena memiliki kekuatan 50-100 kali lebih kuat dibandingkan dengan vitamin E dan bersifat membantu kerja vitamin C dan E pada aktivitasnya sebagai antioksidan, serta tidak bersifat sebagai prooksidan (Wahyuningsih, 2011). Astaxanthin melindungi tubuh terhadap proses peroksidasi lipid dan kerusakan yang diakibatkan oleh proses oksidasi yang terjadi pada membran sel jaringan tubuh (Winarsi, 2007; Rao dkk., 2013).

Astaxanthin juga dapat mempengaruhi aktivitas pigmentasi melalui interaksi parakrin antara keratinosit dan melanosit (Niwano dkk., 2015), serta menekan aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam pembentukan melanin (Nakajima dkk., 2012; Imokawa dan Ishida, 2014). Rao dkk. (2013) melakukan penelitian pada tikus wistar jantan yang dipapar UVB menyatakan adanya efek proteksi dari astaxanthin terhadap aktivitas tirosinase.

Dari penelitian menggunakan krim astaxanthin 0,01%, 0,02% dan 0,03% pada kulit marmut yang dipapar sinar UVB, didapatkan bahwa krim astaxanthin 0,02% paling efektif mencegah peningkatan jumlah melanin (Sitanggang, 2017). Kemampuan astaxanthin sebagai antioksidan yang dapat diberikan dalam bentuk topikal memberi harapan baru dalam pilihan terapi dan pencegahan hiperpigmentasi tanpa efek samping seperti yang dapat ditimbulkan oleh penggunaan hidrokuinon. Suatu penelitian *in vivo* masih diperlukan untuk menilai efektivitas astaxanthin dibandingkan dengan hidrokuinon topikal dalam melindungi kulit dari masalah hiperpigmentasi akibat paparan UV.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan *post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo*, menggunakan hewan

coba marmut (*Cavia porcellus*) sebanyak 30 ekor, berumur 3 bulan, jenis kelamin jantan dan berat badan antara 300-350 gram, dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara random dan masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor marmut. Tiga kelompok tersebut adalah kelompok 1 (kontrol) yaitu kelompok yang diberikan bahan dasar krim (P0); kelompok 2 adalah kelompok yang diberikan krim hidrokuinon 4% (P1); kelompok 3 adalah kelompok yang diberikan krim astaxanthin 0,02% (P2).

Paparan UV B diberikan pada masing-masing kelompok sebanyak 3 kali seminggu (Senin-Rabu-Jumat) dengan dosis 65 mJ/cm² selama 130 detik setiap sesi, sehingga total UVB yang diterima selama 2 minggu adalah 390 mJ/cm². Aplikasi bahan topikal yaitu bahan dasar krim, krim hidrokuinon 4% dan krim astaxanthin 0,02% dilakukan 2 kali sehari, yaitu 20 menit sebelum dipapar UV B untuk memberikan waktu penyerapan bahan topikal pada kulit dan diulang kembali 4 jam setelah paparan UVB. Aplikasi bahan topikal tetap dilakukan sehari tanpa penyinaran. Untuk menyingkirkan pengaruh penyinaran akut, semua marmut dari ketiga kelompok diistirahatkan selama 48 jam setelah penyinaran terakhir. Untuk pemeriksaan dilakukan biopsi jaringan kulit bagian punggung dengan ukuran 1cm x 1cm sampai subkutan, ketebalan kira-kira 2 mm. Kemudian dibuat sediaan histopatologis untuk pemeriksaan melanin. Marmut di euthanasia diberikan perlakuan dengan menggunakan ketamine dosis berlebih (100mg/kgBB) secara intraperitoneal (Santoso, 2011).

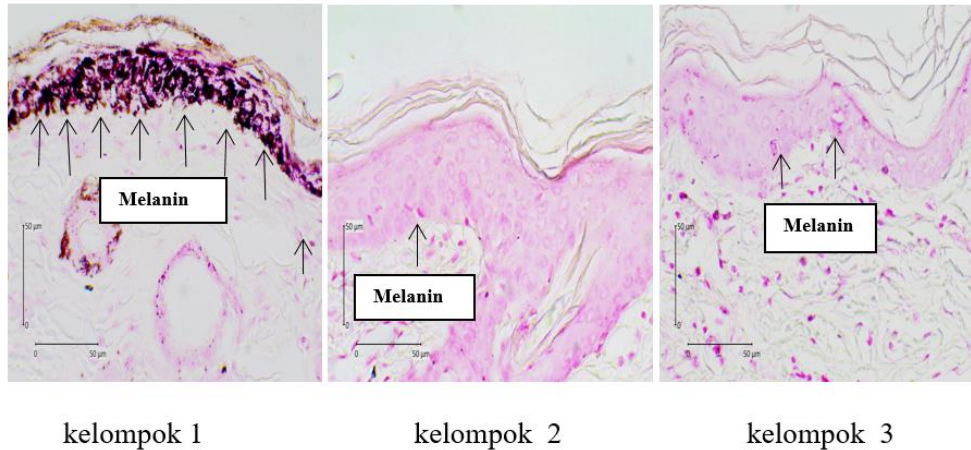
Setelah 2 minggu perlakuan, jaringan kulit dipotong pada daerah punggung sampai kedalaman di bawah kulit. Setelah itu dibuat preparat histopatologis menggunakan pewarnaan *Masson Fontana* yang memberikan warna hitam pada melanin. Jumlah melanin dihitung dengan persentase pixel luas area melanin dibandingkan dengan pixel seluruh jaringan epidermis.

HASIL PENELITIAN

Setelah dua minggu perlakuan, jaringan kulit punggung marmut dibiopsi untuk dilakukan pemeriksaan histopatologis. Melanin akan berwarna hitam pada pewarnaan *Masson Fontana* (Gambar 1). Hasil analisis

menunjukkan rata-rata jumlah melanin pada kelompok UV-B+ krim dasar adalah $27,55 \pm 3,63\%$ dengan nilai minum 21,67% dan maksimum 35,21%. Rata-rata jumlah melanin pada kelompok UV-B+ krim hidrokuinon 4% adalah $0,90 \pm 0,26\%$ dengan nilai minimum

0,52% dan maksimum 1,42%. Sedangkan pada kelompok UV-B + krim astaxanthin 0,02%, rata-rata jumlah melanin adalah $1,09 \pm 0,40\%$ dengan nilai minimum dan maksimum berturut-turut adalah 0,62% dan 1,92% (Tabel 1).



Gambar 1. Gambaran Melanin Kulit Marmut Dengan Pewarnaan *Masson Fontana*

Jaringan histopatologis epidermis kulit marmut dengan pembesaran 400x. Gambaran melanin ditunjuk oleh tanda panah. Pada kelompok 1 (kontrol) terlihat kumpulan melanin berwarna hitam yang padat berkelompok memenuhi area basal epidermis dan seluruh lapisan atas epidermis, pada kelompok 2 (krim hidrokuinon 4%) terlihat melanin berwarna hitam yang tidak berkelompok dan tidak padat di basal epidermis dan sedikit menyebar ke lapisan atas epidermis, pada kelompok 3 (krim astaxanthin 0,02%) terlihat melanin berwarna hitam sedikit berkelompok dan sedikit menyebar ke lapisan atas epidermis.

Uji lanjutan dengan menggunakan *Least Significance Difference (LSD) test* menunjukkan bahwa ada perbedaan rerata jumlah melanin yang signifikan antara kelompok UV-B+ krim dasar dengan kelompok UV-B + krim hidrokuinon 4% dan

kelompok UV-B + krim astaxanthin 0,02% dengan nilai $p=0,001$ ($p<0,05$) dengan perbedaan rata-rata sebesar 26,65 dan 26,46. Hal ini berarti baik pemberian krim hidrokuinon 4% dan krim astaxanthin 0,02% menunjukkan efektifitas yang sama yaitu dapat mencegah peningkatan jumlah melanin dibandingkan dengan kelompok yang diberikan krim dasar. Tidak ada perbedaan rerata yang signifikan terhadap jumlah melanin antara kelompok UV-B + krim hidrokuinon 4% dan kelompok UV-B + krim astaxanthin 0,02%. Perbedaan rerata diantara kedua kelompok ini sebesar 0,19 dan nilai p sebesar 0,842 ($p>0,05$). Hal ini menandakan bahwa baik krim hidrokuinon 4% dan krim astaxanthin 0,02% menunjukkan pengaruh efektifitas yang sama dalam mencegah peningkatan jumlah melanin marmut yang dipapar sinar UV-B jika dibandingkan dengan kelompok pemberian krim dasar.

Tabel 1. Perbedaan Rerata Jumlah Melanin pada Masing-Masing Kelompok

Kelompok Subjek	n	Rerata Jumlah Melanin (%)	SB	F	p
UV-B+ Krim Dasar	10	27,55 ^a	3,63	524,881	0,001
UV-B + Hidrokuinon 4%	10	0,90 ^b	0,26		
UV-B + Krim Astaxanthin 0,02%	10	1,09 ^b	0,40		

n= jumlah ulangan; SB= simpangan baku; F= Anova hitung, p= taraf signifikansi. Notasi yang sama (a,b) pada rerata menunjukkan tidak berbeda ($p>0,05$), notasi yang berbeda (a,b) pada rerata menunjukkan berbeda bermakna ($p<0,05$), diuji dengan LSD test.

PEMBAHASAN

Melanin adalah komponen yang dihasilkan oleh sel melanosit yang berfungsi sebagai penyerap sinar UV dan penahan radikal bebas sehingga dapat melindungi kulit dari kerusakan akibat sinar UV. Radiasi sinar UV menyebabkan pigmentasi oleh beberapa cara yaitu peningkatan kerja enzim melanogenik, peningkatan transfer melanosom menuju keratinosit, peningkatan aktivitas dendritik sel melanosit, dan kerusakan DNA akan menstimulasi proses melanogenesis itu sendiri. (Kindred dan Halder, 2010). Sel keratinosit juga sangat berperan dalam peningkatan sintesis melanin. Setelah terpapar oleh sinar UV maka sel keratinosit akan mengeluarkan berbagai macam sitokin, hormon dan *growth factors* yang akan ditangkap oleh reseptor sel melanosit sehingga terjadi peningkatan aktivitas enzim melanogenik dan distribusi melanin ke keratinosit (Costin dan Hearing, 2007).

Pembentukan ROS oleh paparan sinar UVB dapat melalui interaksi langsung maupun tidak langsung. Interaksi langsung UVB berupa *cross-linking* basa primidin berdekatan, yang menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan ikatan dengan asam aromatik sehingga akan mengakibatkan pembentukan radikal bebas. Interaksi tidak langsung UVB menyebabkan terbentuknya ROS melalui fotosensitisasi yang akan merubah elektron pada kromofor sehingga terjadi produksi radikal bebas. ROS yang meningkat akibat paparan sinar UVB menyebabkan peningkatan proses melanogenesis (Costin dan Hearing, 2007). Jumlah melanin pada penelitian ini dilihat dari sediaan histopatologis jaringan kulit dengan pewarnaan *Masson-Fontana* yang memberikan warna hitam pada melanin.

Astaxanthin adalah antioksidan alami golongan betakaroten yang dapat melindungi tubuh dari proses peroksidasi lipid dan kerusakan yang diakibatkan oleh proses oksidasi yang terjadi pada membran sel jaringan tubuh (Winarsi, 2007; Rao dkk.,2013). Sesuai dengan struktur dan mekanisme kerjanya, astaxanthin mampu meredam singlet oksigen melalui mekanisme fisik dimana energi yang berlebih dari singlet oksigen akan ditambahkan atau ditransfer ke struktur karotenoid yang kaya akan elektron untuk diubah menjadi panas (Yuan dkk, 2011).

Astaxanthin dapat menurunkan ekspresi gen spesifik melanosit seperti *tyrosinase* (TYR) dan *tyrosinase related protein-1* (TYRP1) yang berperan dalam sintesis melanin, melalui efek supresi pada *stemcell factor* (SCF) dan *Microphtalmia-associated transcription factor* (MITF) pada level transkripsi dan translasi (Nakajima dkk., 2012; Imokawa dan Ishida, 2014). Astaxanthin juga mempengaruhi aktivitas pigmentasi melalui interaksi parakrin antara keratinosit dan melanosit yang berperan dalam melanogenesis (Niwano dkk., 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa krim hidrokuinon 4% dan krim astaxanthin 0,02% sama efektif dalam mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut yang dipapar sinar UV-B. Kelompok kontrol memiliki jumlah melanin yang paling tinggi, hal ini menunjukkan pembentukan melanin lebih banyak terjadi. Jumlah melanin yang paling tinggi didapatkan pada kelompok kontrol disebabkan oleh paparan sinar UVB berulang. Paparan sinar UVB akan meningkatkan sintesis melanin oleh sel melanosit. Proses pembentukan melanin memerlukan enzim tirosinase. Enzim

tirosinase akan bekerja setelah terpapar oleh sinar UVB (Baumann dan Saghari, 2009).

Pada kelompok 2 yaitu kelompok yang diberikan krim hidrokuinon 4% ditemukan jumlah melanin yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol. Telah diketahui bahwa hidrokuinon 4% adalah baku emas untuk pengobatan hiperpigmentasi. Mekanisme kerja dari hidrokuinon adalah menghambat kerja enzim tirosinase, merusak sel melanosit langsung dan mempercepat degradasi melanosom (Bruce, 2013).

Pada kelompok 3 yaitu kelompok yang diberikan krim astaxanthin 0,02% ditemukan jumlah melanin yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa perlindungan astaxanthin mencegah peningkatan jumlah melanin akibat paparan UVB. Astaxanthin sebagai antioksidan menghambat atau menghentikan kerusakan oksidatif yang terjadi dengan cara memberikan senyawa elektron kepada molekul radikal bebas sehingga efek peningkatan pembentukan melanin oleh radikal bebas dapat dicegah. Selain itu astaxanthin juga dapat menurunkan aktivitas pigmentasi dengan menekan aktivitas tirosinase.

Kemampuan astaxanthin untuk melindungi kulit dari hiperpigmentasi akibat paparan sinar ultra violet ini diharapkan dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Untuk dapat dijamin keamanannya pada manusia perlu dilakukan sebuah uji klinis mengenai efek krim astaxanthin dalam mencegah peningkatan jumlah melanin pada kulit manusia akibat paparan sinar ultraviolet. Mengingat negara kita memiliki intensitas matahari yang cukup tinggi sepanjang tahun dan aktivitas masyarakat sebagian besar dilakukan di luar ruangan. Penggunaan perlindungan fisik seperti baju lengan panjang, topi, dan payung tentunya akan lebih optimal jika digabungkan penggunaannya dengan krim astaxanthin secara topikal untuk menambah cadangan antioksidan kulit.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan simpulan sebagai berikut:

1. Pemberian krim astaxanthin 0,02% mencegah peningkatan jumlah

melanin kulit marmut (*Cavia porcellus*) yang dipapar sinar UVB.

2. Pemberian krim astaxanthin 0,02% sama efektifnya dengan krim hidrokuinon 4% dalam mencegah peningkatan jumlah melanin kulit marmut (*Cavia porcellus*) yang dipapar sinar UVB.

DAFTAR PUSTAKA

- Baumann, L., Allemen, I. B. (2009). Depigmentation Agent. In: Baumann L., Saghari, S., Weisberg, E., editors. *Cosmetic Dermatology*. 2nd edition. New York: Mc Graw Hill. p 280-288.
- Baumann, L., Saghari, S. (2009). Skin Pigmentation and Pigmentation Disorders. In: Baumann, L., Saghari, S., Weisberg, E., editors. *Cosmetic Dermatology*. 2nd edition. New York: McGraw Hill. p 98-106.
- Bernerd, F., Marionnet, C., Duval, C. (2012). Solar Ultraviolet Radiation Induces Biological Alterations In Human Skin In Vitro: Relevance of A Well-Balanced UVA/UVB Protection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78:15-23.
- Bruce, S. (2013). Safety and efficacy of a Novel Multimodality Hydroquinone Free Skin Brightener Over Six Months. Available from: <http://jddonline.com/articles/dermatology/S1545961613S0027X#close>. Accessed at September 27, 2017.
- Chandra, M., Levit, J., Pensabene, C. A. (2011). Hydroquinone Therapy for Post Inflammatory Hyperpigmentation Secondary to Acne. *Acta Dermatology Venerology*. 91: XX-XX.
- Costin, G. E., Hearing, V. J. (2007). Human Skin Pigmentation: Melanocytes Modulate Skin Color in Response to Stress. Available from: <http://www.fasebj.org/content/21/4/976.full>. Accessed at September 27, 2017.
- Hadiyati, P. U., Sibero, H. T., Apriliana. (2014). Quality of Life of Melasma Patients at Dr. H. Abdul Moeloek Hospital in Lampung. *Medical Journal of Universitas Lampung*. ISSN 2337-3776.
- Ichihashi, M., Ando, H., Yoshida, M., Niki, Y., Matsui, M. (2009). Photoaging of

- The Skin. *Journal of Anti Aging Medicine*, 6 (6): 46-59.
- Imokawa, G., Ishida, K. (2014). Inhibitors of Intracellular Signaling Pathways that Lead to Stimulated Epidermal Pigmentation: Perspective of Anti-Pigmenting Agent. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 82 93-8315; doi:10.3390/ijms15058293. Available from: <https://www.mdpi.com/journal/ijms>. ISSN 1422-0067. Accessed at June 20, 2017.
- Kindred, C., Halder, R. M. (2010). Pigmentation and Skin of Color. In: Draelos, Z. D., editor. *Cosmetic Dermatology Products and Procedures*. 1st edition. New Jersey: Wiley-Blackwell. p 27-35.
- Lapeere, H., Boone, B., Schepper, S.D., Verhaeghe, E., Ongenae, K., Geel, N.V. (2008). Hypomelanosis and Hypermelanosis. In: Wollf, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrist B. A., editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th edition. Vol 1. New York: Mc Graw Hill. p 623-640.
- Moertolo, T. (2009). Pengaruh Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4, 4'-dione) Topikal dan Sistemik terhadap Melasma Tipe Epidermal. Makalah Simposium The Natural Astaxanthin Symposium: An Update on Clinic Research. 2009: 1-14.
- Nakajima, H., Fukazawa, K., Wakabayashi, Y., Imokawa, G. (2012). Abrogating Effect of a Xanthophyll Carotenoid Astaxanthin on the Stem Cell Factor-Induced Stimulation of Human Epidermal Pigmentation. *Arch Dermatol Res.* 304:803. DOI:10.1007/s00403-012-1248-y. Accessed at June 17, 2017.
- Niwano, T., Terazawa, S., Nakajima, H., Imokawa, G. (2015). Astaxanthin and Withaferin A Block Paracrine Cytokine Interactions between UVB-Exposed Human Keratinocytes and Human Melanocytes via the Attenuation of Endothelin-1 Secretion and its Downstream Intracellular Signaling. *Cytokine*. 73(2):184-97.
- Pandel, R., Polsajak, B., Godic, A., Dahmane, R. (2013). Skin Photoaging and The Role of Antioxidants in Its Prevention. *International Scholarly Research Notices. ISRN Dermatology*, Article ID 930164.
- Rao, A.R., Ravi, S., Kadimi, U.S., Gokare, R. (2013). Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Algae *Haematococcus pluvialis*. *Jornal of agricultural and food chemistry* doi: 10.1021/jf304609j.
- Rigopoulos, D., Gregoriou, S., Katsambas, A. (2007). Hyperpigmentation and Melasma. *J Cosmet Dermatol*; 6: 195-202.
- Santoso, M. I. E. (2011). Buku Ajar Etika Penelitian Kesehatan. Malang: Universitas Brawijaya Press (UB Press). Hal 1-270.
- Sitanggang, T. (2017). Penentuan Dosis Krim Astaxanthin Dapat Mencegah Peningkatan Jumlah Melanin pada Kulit Marmut yang dipapar UVB (Penelitian Pendahuluan).. UNUD, Denpasar (*unpublished*).
- Steiner, D., Feola, C., Bialeski, N., Silva F. A. M. (2009). Treatment of Melasma: Systematic Review. *Surgical and Cosmetic Dermatology*. 1 (2): 87-94.
- Wahyuningsih, K.A. (2011). Astaxanthin Memberikan Efek proteksi Terhadap Photoaging. *Damianus Journal of Medicine*. 10(3): 149-160.
- Winarsi, H. (2007). Antioksidan alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Kanisius
- Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K., Wang, J. H. (2011). Potential Health Promoting Effect of Astaxanthin: A High Value Carotenoid Mostly from Micro algae. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 150-65.