

ARTIKEL PENELITIAN

**ANALISIS HISTOPATOLOGI KETEBALAN EPIDERMIS SETELAH  
PENGOLESAN GEL EKSTRAK CURCUMIN PADA MENCIT ALBINO  
YANG DIINDUKSI 2,4 DINITROCHLOROBENZE  
(*HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF EPIDERMAL THICKNESS AFTER  
APPLICATION OF CURCUMIN EXTRACT GEL IN INDUCED ALBINO MICE  
BY 2,4 DINITROCHLOROBENZE*)**

**Rina Munirah Bulqini, Lina Damayanti**

Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal  
Achmad Yani, Cimahi, Jawa Barat, Indonesia

Email Korespondensi: [rinamunirah@gmail.com](mailto:rinamunirah@gmail.com)

**ABSTRAK**

Agen antiinflamasi topikal dari bahan alami dengan efikasi yang baik dan efek samping minimal sangat diperlukan. Curcumin termasuk bahan alami yang berefek anti inflamasi. Namun penelitian dalam bentuk topikal masih sangat jarang. Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek topikal gel ekstrak *Curcumin* terhadap inflamasi kulit mencit yang diinduksi 2,4 *dinitrochlorobenzen* (DNCB). Studi menggunakan *randomized posttest –only control group design* dengan sampel 30 ekor mencit albino dalam 6 kelompok. Ketebalan epidermis diukur dari lapisan sel basal hingga stratum korneum menggunakan *ImageJ software*. Tidak terdapat perbedaan signifikan rerata ketebalan epidermis antara kelompok mencit yang diberikan aplikasi gel ekstrak Curcumin dengan kelompok yang tidak diberikan gel ekstrak Curcumin. Penebalan epidermis terjadi jika dermatitis kontak iritan berupa dermatitis kontak iritan kronis. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menilai efek anti inflamasi ini pada inflamasi kronik.

**Kata kunci:** curcumin, DNCB, gel, stratum korneum

**ABSTRACT**

*Topical anti-inflammatory agents from natural remedies with good efficacy and minimal side effects are needed. Curcumin is a natural remedy that has anti-inflammatory effects. However, research in topical form is still very rare. This study aims to assess the effect of topical Curcumin extract gel on 2,4 dinitrochlorobenzen DNCB-induced skin inflammation in mice. The study used a randomized posttest –only control group design with a sample of 30 albino mice in 6 groups. Epidermis thickness was measured from the basal cell layer to the stratum corneum using ImageJ software. There was no significant difference in the mean thickness of the epidermis between the group of mice that were given Curcumin extract gel application and the group that was not given Curcumin extract gel. Thickening of the epidermis occurs if irritant*

*contact dermatitis takes the form of chronic irritant contact dermatitis. Further research is needed to assess this anti-inflammatory effect on chronic inflammation.*

*Keyword: curcumin, DNCB, gel, stratum korneum*

## **PENDAHULUAN**

Kulit berperan sebagai pelindung fisik terhadap berbagai faktor penyebab kerusakan termasuk paparan zat kimia. Paparan berulang akan menyebabkan timbulnya respon fisiologis yang berperan melindungi tubuh dari cedera jaringan, berupa inflamasi pada kulit.<sup>1,2</sup> Namun jika inflamasi terjadi tidak adekuat, akan menimbulkan infeksi patogen yang menetap.<sup>2,3,4,5</sup> Sehingga sangat diperlukan agen antiinflamasi topikal yang aman, efektif dengan efek samping minimal.<sup>6</sup>

Komponen organik seperti *1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)* *cycloheximide benzene* sering digunakan sebagai *sensitizer* timbulnya gejala yang menyerupai dermatitis kontak pada mencit.<sup>7</sup>Salahsatu penanda histologis adanya dermatitis kontak adalah penebalan lapisan epidermis dan lapisan luar dermis oleh karena infiltrasi sel imun.<sup>8</sup>

*Natural remedies* dapat digunakan sebagai pengobatan komplementer untuk inflamasi pada kulit.<sup>9</sup> Curcumin termasuk *natural remedies* yang berefek antiinflamasi serta mengandung lipofilik polifenol<sup>10</sup> yang merupakan agen terapeutik potensial<sup>11</sup> dan paling banyak diteliti.<sup>12</sup>

Bentuk gel lebih dipilih karena karakter *control release* baik, memiliki kemampuan mencapai target epidermis yang *viable*, mudah dimanipulasi *swelling levelnya* dan memiliki kompatibilitas jaringan yang baik.<sup>13</sup> *Curcumin* dalam *topical base gel* juga memberikan perbaikan cepat pada luka bakar tanpa timbulnya skar dan menghilangkan pembengkakan akibat *crush injury*. Selain itu, Curcumin gel 0,1% *solid lipid nanoparticle* diketahui tidak bersifat iritatif, dan mampu menekan pembengkakan telinga mencit dan mengurangi kandungan air dalam model mencit yang diinduksi dermatitis.<sup>13</sup>

Namun demikian, penelitian-penelitian topikal *Curcumin* masih terbatas. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk menilai efek topikal gel ekstrak *Curcumin* terhadap inflamasi kulit mencit yang diinduksi DNCB agar dapat menjadi usulan inovasi obat anti inflamasi alami.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba dengan rancangan *randomized posttest – only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2020 selama 3 hari di Laboratorium Animal

Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin (FK UNHAS). Pemeriksaan Histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNHAS dan Sentra Diagnostik Patologia Makassar. Besar sampel yang digunakan mengacu pada rumus Federer, yaitu sebanyak 30 ekor mencit albino yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan..

Prosedur penelitian diawali dengan pembuatan *gel ekstrak curcumin*, pengenceran zat DNCB, pembuatan model binatang, induksi Inflamasi, biopsi kulit dan pemeriksaan histopatologi, analisi statistik menggunakan software statistik versi 25.

DNCB yang digunakan adalah buatan Sigma Aldrich, USA. Kemasan botol kaca berisi 10gram DNCB. DNCB 0,5gram dilarutkan dalam 50ml aseton dan *olive oil* dengan perbandingan 4:1 sehingga menjadi homogen. Dosis DNCB yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 1% sehingga setiap mencit diinduksi dengan DNCB sebanyak 10  $\mu$ L.

Prosedur induksi inflamasi diawali dengan mencukur rambut punggung mencit menggunakan *hair removal cream* secara hati-hati, kemudian area punggung mencit ditandai seluas 1 cm<sup>2</sup> yang akan dioleskan DNCB, *base gel* dan gel ekstrak Curcumin. Sebanyak 10 mikroliter DNCB 1% diaplikasikan secara topikal pada area punggung mencit. Segera setelah dioleskan DNCB, sebanyak 0,5 gram gel curcumin

diaplikasikan secara merata pada daerah punggung seluas 1 cm<sup>2</sup> sesuai kelompok. Kemudian semua kelompok dilakukan biopsi untuk pemeriksaan histopatologi dan dilakukan perawatan mencit pasca biopsi.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dengan nomor 534/UN4.6.4.5.31/PP36/2020.

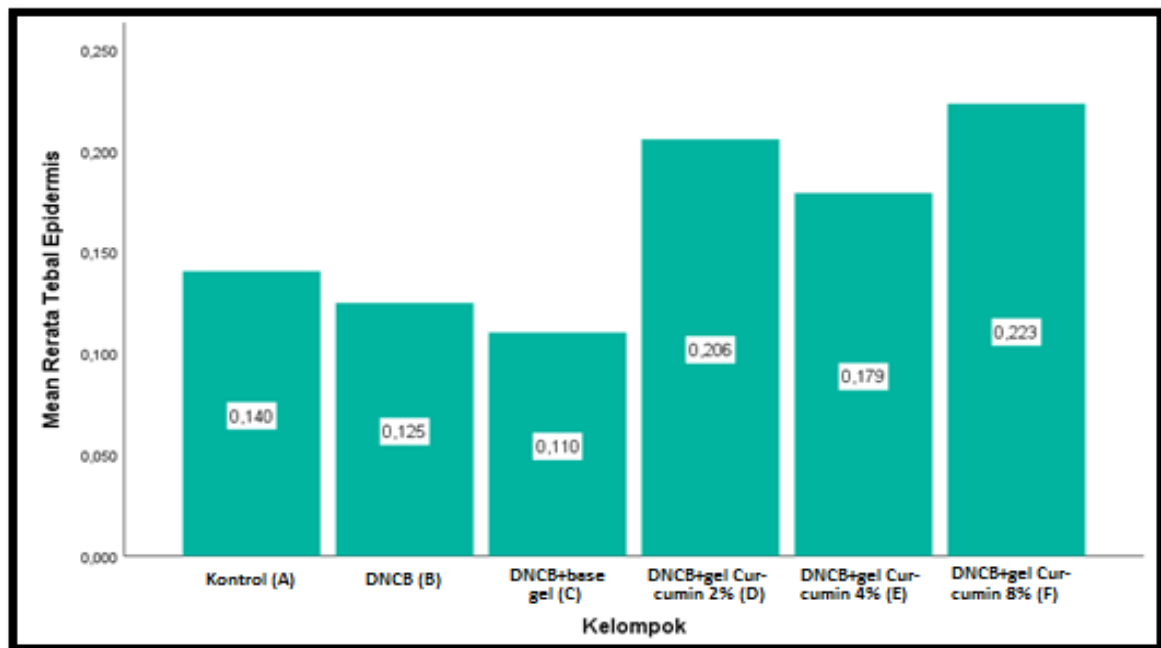
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian eksperimental murni untuk mengetahui efek gel ekstrak Curcumin pada 30 ekor mencit yang di bagi menjadi 6 kelompok. Kelompok pertama (A) adalah kelompok kontrol yaitu 5 ekor mencit tanpa perlakuan yang di eliminasi setelah 3 hari. Kelompok kedua (B) adalah 5 ekor mencit yang diinduksi DNCB. Kelompok ketiga (C) adalah 5 ekor mencit yang diinduksi DNCB dan diberi *base gel* segera setelah induksi, 12 jam dan 24 jam, 36 dan 48 jam dan 60jam serta 72jam pasca induksi DNCB. Kelompok keempat (D) adalah 5 ekor mencit yang diinduksi DNCB dan diberi gel ekstrak Curcumin 2% secara topikal segera setelah induksi DNCB, 12 jam dan 24 jam, 36 dan 48 jam dan 60jam serta 72jam pasca induksi DNCB. Kelompok kelima (E) adalah 5 ekor mencit yang diinduksi DNCB dan diberi gel ekstrak Curcumin 4% secara topikal segera setelah induksi DNCB, 12 jam dan 24 jam, 36 dan 48 jam dan 60jam serta 72jam pasca induksi

DNCB. Kelompok keenam (F) adalah 5 ekor mencit yang diinduksi diinduksi DNCB dan diberi gel ekstrak Curcumin 8% secara topikal segera setelah induksi DNCB, 12 jam dan 24 jam, 36 dan 48 jam dan 60jam serta 72jam pasca induksi DNCB.

Hasil analisis data pemeriksaan ketebalan epidermis diperoleh bahwa bahwa sebaran data ketebalan epidermis berdistribusi normal pada masing-masing kelompok. Pada kelompok kontrol, didapatkan tebal epidermis antara 0,114 – 0,174 dengan nilai *mean* (rerata) 0,140±0,026. Pada kelompok yang diinduksi DNCB, didapatkan tebal epidermis antara 0,039 – 0,185 dengan nilai

*mean* (rerata) 0,125±0,077. Pada kelompok yang diinduksi DNCB dan diberi *base gel*, didapatkan tebal epidermis antara 0,051 – 0,228 dengan nilai *mean* (rerata) 0,110±0,102. Pada kelompok yang diinduksi DNCB dan diberi gel Curcumin 2%, tebal epidermis antara 0,145 – 0,320 dengan nilai *mean* (rerata) 0,206±0,071. Pada kelompok yang diinduksi DNCB dan diberi gel Curcumin 4%, didapatkan tebal epidermis antara 0,133 – 0,261 dengan nilai *mean* (rerata) 0,179±0,050. Pada kelompok yang diinduksi DNCB dan diberi gel Curcumin 8%, didapatkan tebal epidermis antara 0,177 – 0,292 dengan nilai *mean* (rerata) 0,223±0,044. Hal ini seperti terlihat pada gambar 1 dan tabel 1.



Gambar 1 Rerata ketebalan epidermis pada tiap kelompok perlakuan.

**Tabel 1** Analisis deskriptif tebal Epidermis pada berbagai kelompok

Kelompok	n	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Distribusi Data*
Kontrol (A)	5	0,114	0,174	0,140	0,026	
DNCB (B)	3	0,039	0,185	0,125	0,077	
DNCB+base gel (C)	3	0,051	0,228	0,110	0,102	
DNCB+ gel Curcumin 2% (D)	5	0,145	0,320	0,206	0,071	Normal (p=0,200)
DNCB+ gel Curcumin 4% (E)	5	0,133	0,261	0,179	0,050	
DNCB+ gel Curcumin 8% (F)	5	0,177	0,292	0,223	0,044	

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa pada uji Anova (tabel 2) tidak didapatkan perbedaan signifikan rerata tebal epidermis antara 6 (enam) kelompok (p=0,081).

Salah satu peran utama kulit adalah melindungi dari faktor eksternal seperti suhu ataupun bahan kimia. Kulit mampu memproses dan merespon berbagai macam paparan bahan kimia. Tubuh berespon terhadap trauma ataupun patogen dengan Inflamasi.<sup>2,3,4,6</sup>

Kerusakan epidermis merupakan tanda utama gejala dermatitis kontak iritan yang berbeda dengan gejala dermatitis kontak alergi. Pada dermatitis kontak iritan umumnya lebih menunjukkan inflamasi epidermis dibandingkan inflamasi dermis. Dermatitis kontak iritan ditandai dengan kemerahan, fissure, oozing dan nyeri.<sup>16</sup>

Secara makroskopik, munculnya tanda-tanda inflamasi pada penelitian ini tidak begitu terlihat jelas. Hal ini dimungkinkan karena pada penelitian ini terdapat penurunan konsentrasi zat *1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)* yang digunakan, yaitu menggunakan konsentrasi 1% yang diperoleh berdasarkan hasil *preliminary* yang peneliti lakukan. Namun demikian, secara histopatologi zat *1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)* terbukti menimbulkan tanda-tanda inflamasi yang lebih terlihat jelas.

Penebalan epidermis merupakan penanda histologis adanya dermatitis kontak<sup>8</sup> dan *1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)* merupakan *sensitizer* munculnya gejala mirip dermatitis kontak pada mencit.<sup>7</sup>

**Tabel 2** Perbandingan rerata tebal epidermis pada berbagai kelompok

Variabel	Kelompok	n	Mean	Std. Deviation	p
Rerata Tebal Epidermis	Kontrol (A)	5	0,140	0,026	0,081
	DNCB (B)	3	0,125	0,077	
	DNCB+base gel (C)	3	0,110	0,102	
	DNCB+ gel Curcumin 2% (D)	5	0,206	0,071	
	DNCB+ gel Curcumin 4% (E)	5	0,179	0,050	
	DNCB+ gel Curcumin 8% (F)	5	0,223	0,044	

*Anova-Test*

Dari penelitian ini pula didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan tebal epidermis antara kelompok mencit yang diberikan topikal gel ekstrak Curcumin dengan kelompok mencit yang tidak diberikan topikal gek ekstrak Curcumin. Hal ini berbeda dengan penelitian Heo J.H., et al pada tahun 2018 dan Chen C.C., et al pada tahun 2017 yang menunjukkan bahwa pada pemeriksaan histopatologik dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, DNCB dapat menginduksi penebalan epidermis dan lapisan luar dermis dengan memberikan gambaran hiperplasia epidermis, keratinisasi berat termasuk hiperkeratosis dan parakeratosis serta vasodilatasi signifikan dan meningkatnya infiltrasi sel imun di dermis. Hal ini kemungkinan karena terdapat perbedaan dalam cara pengolesan. Selain itu, adanya perbedaan

hasil penelitian ini dimungkinkan karena penebalan epidermis terjadi jika dermatitis kontak iritan berupa dermatitis kontak iritan berulang dan terus menerus.<sup>16</sup>

Namun, menariknya pada penelitian ini didapatkan rerata ketebalan epidermis pada kelompok yang diberikan gel ekstrak Curcumin baik 2%, 4% ataupun 8% (kelompok D, E, F) sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok induksi (kelompok B) dan kelompok kontrol (kelompok A). Hal ini dikarenakan curcumin merupakan antioksidan poten, anti inflamasi, dan anti infeksi yang berperan dalam proses resolusi luka.<sup>17,18</sup> *Curcumin* yang diberikan secara topikal efektif untuk berbagai keadaan dengan jejas pada kulit dan inflamasi. Mekanisme utamanya berupa penghambatan enzim Fosforilase Kinase.<sup>14</sup>

Selain itu, *Curcumin* merupakan *selective inhibitor* enzim Fosforilase Kinase. Enzim ini penting dalam glikogenolisis yang berperan untuk pembentukan ATP dan berperan penting dalam reaksi fosforilase.<sup>15</sup> Enzim Fosforilase akan keluar dalam waktu 5 menit setelah *injury* dan memiliki efek penting dalam aktivasi sel-sel inflamasi, penyembuhan luka dan pembentukan *scar* jaringan.<sup>15,19</sup>

*Curcumin* merupakan *selective non-competitive phosphorylase inhibitor* yang dengan cara ini fosforilase kinase *injury pathway* akan terhambat sehingga molekul utama *tissue injury pathway* tidak keluar, yaitu NF-KB sebuah aktivator transkripsi yang umumnya akan keluar dalam 30 menit setelah terjadinya *injury*. Sehingga *curcumin* akan menghambat NF-KB. NF-KB diketahui bertanggung jawab dalam proliferasi 200 gen dari sel-sel inflamasi (sel T dan makrofag), migrasi sel, siklus sel termasuk Cyclin D, proliferasi epidermis dan proliferasi fibroblast.<sup>14</sup>

Aplikasi topikal *Curcumin* dapat meningkatkan reepitelisasi dan meningkatkan rata-rata penyembuhan luka.<sup>20</sup> Beberapa uji klinis juga menunjukkan adanya peningkatan rata-rata pertumbuhan epidermis, peningkatan ketebalan lapisan kutikula dan perbaikan luka secara signifikan pada subjek yang diterapi dengan

*Curcumin* dibandingkan subjek yang tidak mendapatkan terapi *Curcumin*.<sup>17,20</sup>

Partoazer et al dalam penelitiannya mengemukakan bahwa dengan pemberian topikal *curcumin* terdapat perbaikan pada derajat luka bakar tikus. Kant et al dalam penelitiannya menemukan bahwa pemberian topikal *curcumin* mempercepat perbaikan luka pada tikus diabet. Lopez et al dalam penelitiannya mengemukakan bahwa *curcumin* yang diberikan secara topikal memberikan perbaikan kerusakan akibat laser CO<sub>2</sub>. Sementara itu sebuah *randomized double blind-placebo controll trial* yang dilakukan Afshariani et al menemukan bahwa topikal *curcumin* dalam rentang pemberian 72 jam efektif menurunkan inflamasi akibat mastitis pada kelompok ibu menyusui.<sup>14</sup>

Dari penelitian ini juga didapatkan bahwa terdapat perbedaan *mean* rerata ketebalan epidermis antara kelompok mencit yang diberikan berbagai konsentrasi *Curcumin* yaitu kelompok induksi DNCB dan diberikan gel *Curcumin* 2% (kelompok D) (0,206±0,071), kelompok E atau kelompok induksi DNCB dan diberikan gel *Curcumin* 4% (0,179±0,050) kelompok F atau kelompok induksi DNCB dan diberikan gel *Curcumin* 8% (0,223±0,044) meskipun tidak signifikan secara statistik. Hal ini dimungkinkan karena adanya perbedaan gizi antara setiap mencit yang memengaruhi ketebalan epidermis.

*Evidence* pada model tikus ataupun model manusia menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang jelas antara *intake* nutrisi dengan struktur kulit baik pada lapisan epidermis, dermis maupun lemak subcutan.<sup>21</sup> Penelitian Hew J, et al (2016) pada 25 mencit menunjukkan bahwa status makronutrien berpengaruh terhadap struktur kulit dan efek tersebut bersifat *age-specific*. Pada mencit jantan, *intake* protein tinggi berhubungan dengan ketebalan epidermis dan dermis ( $p= 0,006$ ). Sementara pada mencit betina, ketebalan dermis sangat berhubungan dengan *intake* karbohidrat.

## KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan signifikan rerata ketebalan epidermis antara kelompok mencit yang diberikan aplikasi gel ekstrak Curcumin dengan kelompok yang tidak diberikan gel ekstrak Curcumin. Diperlukan penelitian lanjutan efek antiinflamasi ini pada keadaan inflamasi kronis dan dalam jangka waktu lebih lama.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis tidak ada konflik kepentingan dengan pihak manapun

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis haturkan kepada berbagai pihak yang turut membantu terlaksananya penelitian dan penyusunan laporannya. Terima kasih pula

kepada LPPM FK Unjani atas bantuan yang telah diberikan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Leung DYM, Berdyshev E, Goleva E. Cutaneous Barrier Dysfunction in Allergic Diseases. 2020; 145: 1485-1497
2. Wufuer, M, Lee, G, Hur W, Jeon, B, Kim, BJ, Choi, T.H, Lee, S. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. Scientific reports. 2016; 6,37471
3. Guo H, Callaway JB, Ting J. Inflammasomes: mechanism of action, Role in Disease and theurapeutics. Nat Med. 2016; July; 21(7): 677-687
4. Pasparakis, M, et al., Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. 2014; 14(5): 289.
5. Paramita, S, Kosala, K, Dzulkifli, D, Saputra, DI, Wijayanti, E. Anti-inflammatory activities of ethnomedicinal plants from Dayak Abai in North Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2017; 18, 1556-1561
6. Abbas, AK, Litchman, AH, Pillai, S. Cellular and molecular immunology 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. 2015: 40-45



7. Chen CC, Liu X, Li Y, Liang H, Li K, Li J, Cheng C, Liu X, Zhong S, Li L, Wang Y. Effect of Acupuncture on 1-Chloro-2,4-dinitrochlorobenzene-induced Allergic Contact Dermatitis in Mice. *J. Acupunct Meridian Stud.* 2017; 10(4):252-260
8. Heo JH, Heo Y, Lee HJ, Kim M, Shin HY. Topical anti-inflammatory and anti-oxidative effect of porcine placenta extract on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced contact dermatitis. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2018; 18: 331
9. Fadus M, Lau C, Bichandani J, Lynch H. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* 2017; 7: 339-346
10. Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma Longa*), and Its Effects on Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2017; 57 (13): 2889-2895
11. Agrawal R, Sandhu SK, Sharma I, Kaur IP. Development and Evaluation of Curcumin-Loaded Elastic Vesicle as an Effective Topical anti-inflammatory Formulation. *AAPS PharmSciTech.* 2014
12. Kunnumakkar AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology.* 2017; 174:1325-1348
13. Shetriya S, Ranpise N, Satpute P, Vidhate B. Skin Targeting of Curcumin Solid Lipid nanoparticles-encapsulated Topical Gel for the Treatment of Pigmentation and Irritant Contact Dermatitis. *Artificial, Cells, nanomedicine and Biotechnology.* 2018; 46(7): 1471-1482
14. Heng MCY. Topical Curcumin: A Review of Mechanisms and uses in Dermatology. *Int J. Dermatol Clin Res.* 2017; 3 (1): 010-017
15. Spriggs S, Sheffield D, Olayanju A, Kitteringham NR, Naisbitt DJ, Aleksic M. Effect of repeated daily dosing with 2,4-Dinitrochlorobenzene on Glutathione Bioynthesis and NRF activation in reconstructed human epidermis. *Toxicological sciences.* 2017; 154(1); 5 – 15
16. Nedorost, ST. Irritant Dermatitis. In: Kang S, Amagai M, Bruckner AL, Enk AH, Morgolis DJ, McMichael AJ, et al., editors. *Fitzpatrick's*

- Dermatology 9th Ed: McGraw-Hill Education; 2019. p. 418
17. Panahi Y, Fazlolahzadeh O, Atkin S.L, Majeed M., Butler A.E, Johnson T.P, Sahebkar A. Evidence of curcumin and curcumin analogue effects in skindiseases: A narrative review. *J.Cell Physiol.* 2018; 1 – 14
18. Mohanty, C, & Sahoo, SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today.* 2017; 22(10), 1582–1592.
19. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, Inflammation, and Chronic Disease: How are They Linked? *Molecules.* 2015; 20: 9183-9213
20. Kulac, M, Aktas, C, Tulubas, F, Uygur, R., Kanter, M., Erboga, M, Ozen, OA. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. *Journal of Molecular Histology.* 2013; 44(1), 83–90.
21. Hew, J, Solon-Biet SM, McMahon, AC, Ruohonen K, Raubenheimer D, Ballard JW, Le Couter DG, Nicholis C, Li Z, Maitz PK, Wang Y, Simpson S. The effects of dietary macronutrient balance on skin structure in aging male and female mice. *PloS ONE.* 2016; 11(11): e0166175.