

**PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP INHIBISI
MMP-1 DAN PENINGKATAN KOLAGEN
(Studi Eksperimental pada Mencit yang dipapar sinar
UVB Akut)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Sri Purmawanti

MBK.22.20.010334

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2024**

TESIS
PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP
INHIBISI MMP-I DAN PENINGKATAN KOLAGEN
(Studi Eksperimental pada Mencit yang dipapar sinar UVB Akut)

Disusun Oleh:

Sri Purmawanti

MBK.22.20.010334

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 21 Mei 2024 dinyatakan
telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I,


Pembimbing II,



Dr. dr. Joko Wahyu W. M.Kes.
NIK.210198047

Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati M.Kes.
NIK. 220198045

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si., Med
NIK. 210199050

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini Saya menyatakan bahwa tesis ini adalah original hasil pekerjaan Saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 21 Mei 2024



Sri Purmawanti

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul **“PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP INHIBISI MMP-1 DAN PENINGKATAN KOLAGEN (Studi Eksperimental pada Mencit yang dipapar sinar UVB Akut)”**.

Pada penyusunan tesis ini penyusun mendapat pengarahan dan bimbingan, untuk itu penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Prof Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H. Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA dan penguji I yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik, dan telah memberikan masukan serta saran untuk perbaikan tesis ini.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan dorongan, semangat kepada penyusun selama penyusunan tesis ini.

4. Dr. dr.Joko Wahyu W, M.Kes. selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan kepada penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes. selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat, bimbingan dan masukan kepada penyusun selama penyusunan tesis.
6. Prof.Dr.dr.Prasetyowati Subchan SpKK(K) selaku penguji II yang telah memberikan masukan dan saran selama penyusunan tesis.
7. Dr.dr. Pasid Harlisa SpKK selaku penguji III yang telah memberikan masukan dan saran selama penyusunan tesis.
8. Seluruh pegawai dan dokter di Laboratorium Farmasi,PA, IBL Universitas Islam Sultan Agung, Semarang dan Laboratorium PA Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.
9. Para dosen pengajar dan rekan-rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu-satu yang telah memberikan doa, masukan dan bantuan kepada penyusun.
10. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat diselesaikan.
11. Suami dan anak-anak tercinta yang telah memberikan dorongan, semangat serta doa sehingga tesis ini dapat diselesaikan.
12. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Tak ada gading yang tak retak, kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Manusia tidak luput dari kesalahan, penyusun menyadari atas segala kekurangan dalam penulisan tesis ini, semoga tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatNya kepada Kita semua, aamiin.

Semarang, 21 Mei 2024

(Sri Purmawanti)



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
ABSTRAK.....	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. <i>Matriks Metalloproteinase 1 (MMP-1)</i>	7
2.1.1. Metode Pemeriksaan MMP-1	10
2.2. Kolagen.....	12
2.2.1. Metode Pemeriksaan Kolagen	16
2.3. Fotoaging Akibat Paparan UVB.....	18

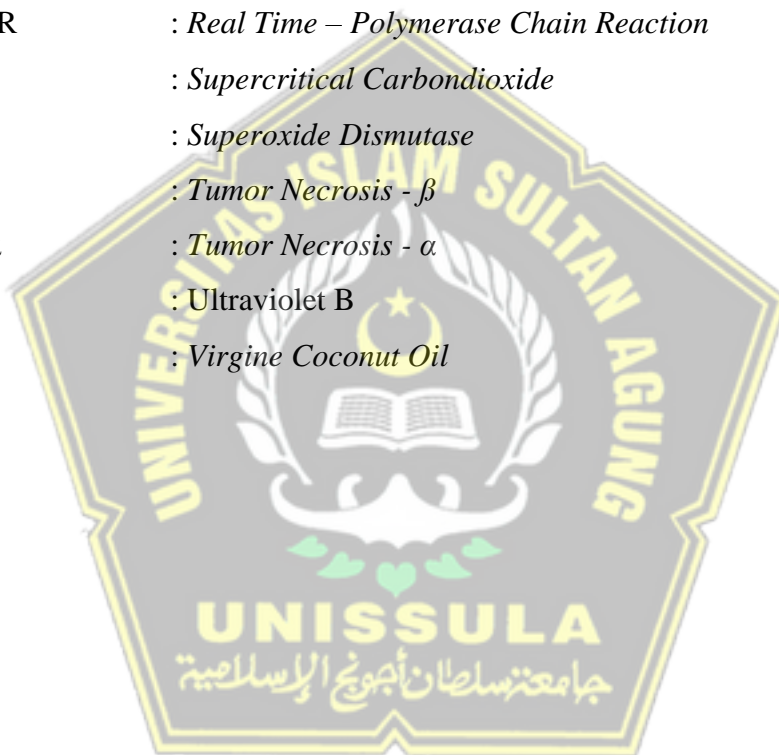
2.3.1. Radikal Bebas Akibat Paparan UVB	22
2.3.2. Pengaruh Radikal Bebas Akibat Paparan UVB terhadap Eksresi Gen	27
2.4. Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	29
2.4.1. Definisi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	29
2.4.2. Taksonomi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	31
2.4.3. Morfologi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	32
2.4.4. Manfaat Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) dalam Mengatasi fotoaging.	33
2.5. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Inhibisi MMP-1 dan Peningkatan Kolagen	43
2.6. Krim Ekstrak Daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	45
2.7. Mencit sebagai Hewan Coba	49
2.7.1. Kriteria Mencit yang Digunakan dalam Percobaan	52
2.7.2. Faktor Perancu pada Mencit sebagai Hewan Coba	54
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	57
3.1. Kerangka Teori	57
3.2. Kerangka Konsep	61
3.3. Hipotesis	61
BAB IV METODE PENELITIAN	62
4.1. Rancangan Penelitian	62
4.2. Populasi Penelitian	63
4.2.1. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	63
4.2.2. Kriteria Drop Out.....	64
4.2.3. Tehnik Pengambilan Sampel Penelitian	64
4.2.4. Jumlah Sampel.....	65
4.3. Definisi Operasional	66
4.3.1. Variabel Bebas	66
4.3.2. Variabel Terikat	66
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	67
4.4.1. Alat	67

4.4.2. Bahan	69
4.5. Cara Penelitian.....	70
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	70
4.5.2. Pembuatan Krim Ekstrak Daun Pegagan.....	70
4.5.3. Penetapan Dosis	72
4.5.4. Pembagian Kelompok Perlakuan.....	72
4.5.5. Perlakuan Paparan UVB dan Pengolesan Krim Ekstrak Daun Pegagan.....	73
4.5.6. Prosedur Pemeriksaan MMP-1	73
4.5.7. Prosedur Pemeriksaan Kolagen	76
4.6. Alur Penelitian	79
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian.....	80
4.8. Analisis Data.....	80
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	81
5.1. Hasil Penelitian.....	82
5.1.1. Ekspresi MMP-1.....	82
5.1.2. Densitas Kolagen	83
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	87
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	93
6.1. Kesimpulan.....	93
6.2. Saran.....	93
DAFTAR PUSTAKA	95
LAMPIRAN.....	105

DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: <i>Activator Protein -1</i>
cDNA	: <i>core Deoxyribonucleic Acid</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNCB	: <i>Dinitro Chlorobenzene</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	: <i>Enzyme - Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	: <i>Extracellular Regulated Kinase</i>
GAGs	: <i>Glycosaminoglycans</i>
GMCSF	: <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
HO-1	: <i>Heme Oxygenase-1</i>
IC50	: <i>Inhibition Concentration 50</i>
IHC	: <i>Immuno Histo Chemistry</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin- 1α</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
JNK	: <i>c-Jun NH2- terminal Kinase</i>
LOX	: <i>Lipoxygenase</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP-1	: <i>Matrix Metalloproteinase-1</i>
MMP-13	: <i>Matrix Metalloproteinase-13</i>
MMP-8	: <i>Matrix Metalloproteinase-8</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MtDNA	: <i>Mitochondria Deoxyribonucleic Acid</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor – kappa B</i>

NLC	: <i>Nanostructured Lipid Carrier</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PLA2	: <i>Phospholipase A2</i>
PVC	: <i>Polyvinyl Chloride</i>
3R	: <i>Replacement, Reduction, Refinement</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Real Time – Polymerase Chain Reaction</i>
ScCO ₂	: <i>Supercritical Carbon dioxide</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
TGF-β	: <i>Tumor Necrosis - β</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis - α</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
VCO	: <i>Virgin Coconut Oil</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 2.1.	Konsentrasi ekstrak daun Pegagan yang digunakan dalam pembuatan sediaan krim anti penuaan	49
Tabel 4.1.	Formula Basis Krim.....	71
Tabel 4.2.	Formula krim yang di buat	72
Tabel 5.1.	Hasil Penelitian Ekspresi MMP-1 dan Densitas Kolagen	84
Tabel 5.2.	Uji <i>Mann Whitney</i> densitas Kolagen antar kelompok penelitian.....	86
Tabel 5.3.	Kandungan Fitokimia Daun Pegagan	88



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	ROS/stres oksidatif berkontribusi terhadap kerusakan dermis melalui induksi beberapa MMP.....	9
Gambar 2.2.	Fotoaging Menyebabkan Penurunan Level Kolagen Pada Dermis	16
Gambar 2.3.	Kolagen muda dan Kolagen yang mengalami aging akibat paparan ROS, terjadi pengurangan ukuran fibroblast.	16
Gambar 2.4.	Mekanisme UVB menginduksi skin aging.....	20
Gambar 2.5.	Gambaran histologi kulit yang mengalami fotoaging.....	22
Gambar 2.6.	Radikal bebas akibat paparan UVB.....	23
Gambar 2.7.	Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	32
Gambar 2.8.	Struktur kimia Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid dan Asiatic acid.....	39
Gambar 2.9.	Mencit sebagai hewan coba.....	50
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	60
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	61
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	62
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	79
Gambar 5.1.	Gambaran Imunohistokimia ekspresi MMP-1.	82
Gambar 5.2.	Uji <i>One Way Anova</i> ekspresi MMP-1	83
Gambar 5.3.	Gambaran mikroskopik densitas Kolagen pewarnaan Sirius Red.	84
Gambar 5.4.	Uji <i>Mann Whitney</i> densitas Kolagen	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	105
Lampiran 2. Surat Izin Penelitian.....	106
Lampiran 3. Surat Keterangan Selesai Penelitian	107
Lampiran 4. Hasil Analisis Data	109
Lampiran 5. Dokumentasi.....	118



ABSTRAK

Latar belakang: Paparan sinar UVB pada kulit menyebabkan peningkatan kadar ROS, meningkatnya status inflamasi di kulit, dan kerusakan DNA. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak daun Pegagan terhadap inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test control group design* terhadap Mencit balb C. Sampel penelitian sebanyak 24 ekor diadaptasi selama 7 hari. Sampel dirandomisasi, dibagi menjadi 4 kelompok, K1, K2, K3, K4. K1 kelompok sehat tidak dipapar UVB. K2, K3, K4 dipapar UVB dosis 1 MED (360mJ/cm²), jarak penyinaran 30cm. K2 dioles basis krim, K3 dan K4 dioles krim Pegagan masing-masing 10% dan 20%. Pada hari keenam diambil sampel jaringan kulit untuk diperiksa ekspresi MMP-1 dengan Imunohistokimia dan densitas Kolagen dengan pewarnaan Sirius Red.

Hasil: Ekspresi MMP-1 pada K3 dan K4 mengalami penurunan namun tidak berbeda bermakna. K3=55,00±12,25, K4=61,67±18,35 dibandingkan dengan K1=53,33±24,22, sedangkan K2=80,83±13,57. Uji *One Way Anova* nilai P = 0,053. Densitas Kolagen berbeda bermakna antara K2 dengan K1 dan K3. Uji *Kruskal Wallis* nilai P=0,04. K1=3,50±0,548, K2 =1,67±0,516, K3 =3,33±0,516, K4 =2,67±1,033. Nilai P pada uji *Mann Whitney* K1 dan K2 =0,02; K2 dan K3 = 0,02.

Kesimpulan: Pemberian krim ekstrak daun Pegagan belum dapat menurunkan ekspresi MMP-1 secara bermakna namun dapat meningkatkan densitas Kolagen secara bermakna dengan dosis 10% pada jaringan kulit Mencit balb C yang dipapar sinar UVB.

Kata Kunci: Krim, Ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica.*), MMP-1, Kolagen, Fotoaging.

ABSTRACT

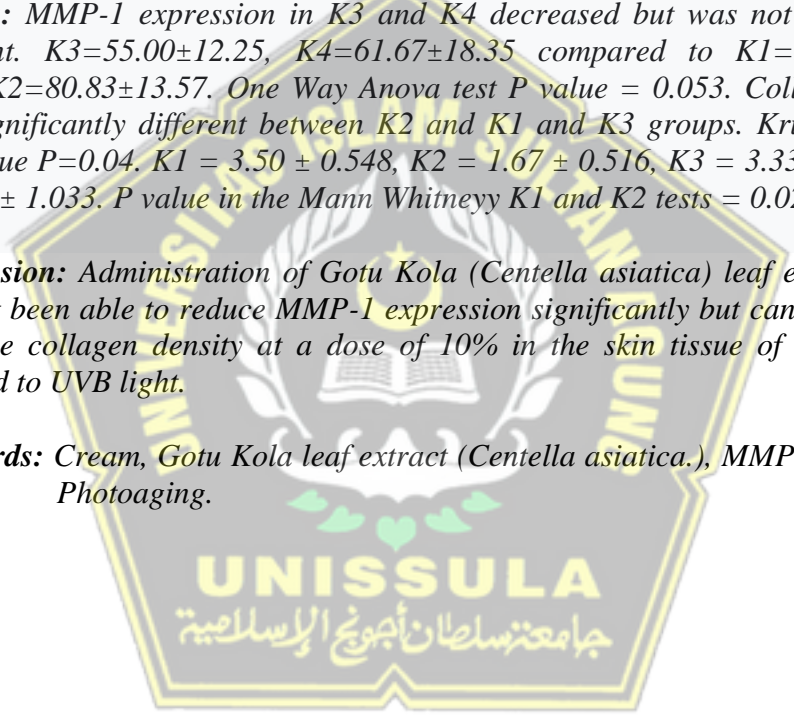
Background: Exposure to UVB rays on the skin causes increased levels of ROS, increased inflammatory status in the skin, and DNA damage.

Method : Experimental research with post test control group design on Balb C mice. A research sample of 24 animals was adapted for 7 days. The sample was randomized, divided into 4 groups, K1, K2, K3, K4. K1 healthy group was not exposed to UVB. K2, K3, K4 were exposed to UVB dose of 1 MED (360mJ/cm²), irradiation distance 30cm. K2 was smeared with cream base, K3 and K4 were smeared with Gotu Kola cream 10% and 20% respectively. On the sixth day, skin tissue samples were taken to examine MMP-1 expression using immunohistochemistry and collagen density using Sirius Red staining.

Results: MMP-1 expression in K3 and K4 decreased but was not significantly different. $K3=55.00\pm12.25$, $K4=61.67\pm18.35$ compared to $K1=53.33\pm24.22$, while $K2=80.83\pm13.57$. One Way Anova test P value = 0.053. Collagen density was significantly different between K2 and K1 and K3 groups. Kruskal Wallis test value $P=0.04$. $K1 = 3.50 \pm 0.548$, $K2 = 1.67 \pm 0.516$, $K3 = 3.33 \pm 0.516$, $K4 = 2.67 \pm 1.033$. P value in the Mann Whitney K1 and K2 tests = 0.02; K2 and K3 = 0.02.

Conclusion: Administration of Gotu Kola (*Centella asiatica*) leaf extract cream has not been able to reduce MMP-1 expression significantly but can significantly increase collagen density at a dose of 10% in the skin tissue of balb C mice exposed to UVB light.

Keywords: Cream, Gotu Kola leaf extract (*Centella asiatica*.), MMP-1, Collagen, Photoaging.



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan sinar Ultraviolet B (UVB) pada kulit menyebabkan berbagai efek mulai dari *sunburn* sampai munculnya keriput di kulit.¹ Paparan sinar UVB menyebabkan peningkatan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*), meningkatnya status inflamasi di kulit, dan kerusakan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). Keadaan ini bisa menyebabkan perubahan molekuler pada kulit yaitu meningkatnya aktifitas *Matriks Metalloproteinase-1* (MMP-1) yang berperan dalam degradasi Kolagen. Kadar Kolagen yang menurun pada kulit merupakan tanda fotoaging. Penanganan fotoaging seringkali dengan pemberian produk kosmetik berbahan kimia sintetis seperti Retinoid topikal yang mempunyai efek samping seperti iritasi kulit, pengelupasan ataupun sensasi terbakar akibat meningkatnya sensitivitas terhadap sinar matahari.² Produk kosmetik yang bersifat alami dan minim efek samping tentunya sangat diperlukan. Indonesia kaya akan tanaman herbal. Pegagan (*Centella asiatica*), salah satu herbal atau tanaman obat yang diketahui mempunyai beragam khasiat dalam bidang kesehatan yaitu mempunyai efek terapeutik dan dermatologis juga di bidang perawatan kecantikan termasuk perawatan wajah.³ Kandungan senyawa bioaktif Pegagan yaitu *Asiaticoside*, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, *Madecassic acid*, *Polyphenols*, *Flavonoid*, *Carotene*, *Tannin*, Vitamin C, bersifat antiinflamasi dan antioksidan sehingga diharapkan bisa menekan

fotoaging yang disebabkan oleh paparan UVB. Sudah ada beberapa penelitian tentang ekstrak daun Pegagan sebelumnya, namun yang meneliti pengaruh krim ekstrak daun Pegagan terhadap inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen belum ada.^{4,5}

Angka kejadian fotoaging dilaporkan mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Pada tahun 1992 di Australia dilaporkan angka kejadian fotoaging sebanyak 42%, pada tahun 1996 sebanyak 51% dan semakin meningkat menjadi 88% pada tahun 2007.⁶ Di Indonesia khususnya di Jakarta, profesi yang banyak terpapar sinar matahari seperti nelayan beresiko tinggi mengalami fotoaging.⁷ Faktor-faktor yang terkait dengan penanganan fotoaging akibat paparan sinar ultraviolet khususnya UVB harus diteliti lebih lanjut.

Pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai efek antiinflamasi dan antioksidan yang penting dalam penanganan fotoaging akibat paparan UVB. Pemberian krim ekstrak daun Pegagan pada penelitian ini diharapkan dapat menjadi *prototype* produk kosmetik anti aging melalui inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen. Penelitian terdahulu menyebutkan pemberian krim ekstrak daun Pegagan 10% memberikan efek peningkatan Kolagen terbaik dengan menekan aktivitas MMP-1 sehingga mengurangi degradasi Kolagen.⁸ Penelitian terhadap Pegagan juga telah dilakukan terhadap *Dinitro Chlorobenzene* (DNCB) pada kasus Dermatitis atopik, *Supercritical Carbondioxide* (scCO₂) pada kasus penyembuhan luka.^{9,10}

Krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan dapat mengatasi kondisi stres oksidatif akibat paparan UVB. Pemilihan sediaan krim dengan alasan karena mudah digunakan yaitu dengan dioleskan. Alasan lain karena sediaan krim lebih sederhana dalam pembuatannya. Penentuan dosis krim ekstrak daun Pegagan mengacu pada penelitian terdahulu bahwa krim ekstrak daun Pegagan dengan dosis 10% menunjukkan efek peningkatan Kolagen terbaik dengan lama penelitian selama 4 minggu. Penelitian ini untuk mengetahui efek krim ekstrak daun Pegagan dengan dosis krim 10% dan 20% dengan lama perlakuan selama 5 hari apakah memberikan efek inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen. Berdasarkan uraian di atas akan dilakukan penelitian mengenai pengaruh krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen pada Mencit yang dipapar sinar UVB akut?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dalam krim kosmetik sebesar 10%, dan 20 % terhadap inhibisi MMP-1.
2. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dalam krim kosmetik sebesar 10%, dan 20% terhadap peningkatan Kolagen.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberi informasi ilmiah mengenai pengaruh krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai *prototype* krim antiaging yang berpengaruh dalam mencegah penuaan kulit melalui inhibisi *Matriks Metalloproteinase 1* (MMP-1) dan peningkatan Kolagen.

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai krim kosmetik dalam upaya preventif mengatasi penuaan kulit akibat fotoaging dengan meningkatkan inhibisi MMP-1 dan meningkatkan sintesis Kolagen secara efektif. Penelitian ini juga dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh krim kosmetik yang berbahan dasar Pegagan (*Centella asiatica*) dalam mencegah fotoaging , sehingga dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya atau penelitian lain pada manusia.

1.5. Originalitas Penelitian

Perbedaan penelitian yang akan dilakukan dengan penelitian sebelumnya adalah variabel bebas menggunakan krim Pegagan (*Centella asiatica*) dan variabel tergantung menggunakan inhibisi MMP-1 dan peningkatan Kolagen pada Mencit yang dipapar sinar UVB akut, pemilihan sediaan krim dengan dosis yang lebih tinggi dan lama perlakuan yang dipersingkat.

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti & Tahun	Judul	Metode Penelitian	Hasil
1.	Venesia, <i>et al</i> (2020) ⁸	Uji Efektivitas Ekstrak <i>Centella asiatica</i> Terhadap Peningkatan Kolagen dan Hidrasi Kulit Putih Wanita Tikus (Rattus Norwegicus Wistar)	Randomized pre dan post-test control group design in vitro	Krim ekstrak <i>Centella Asiatica</i> 10% menunjukkan peningkatan kadar Kolagen tertinggi. Krim <i>Centella asiatica</i> 2,5% menunjukkan kadar Kolagen paling rendah.
2.	Purgianti, <i>et al</i> (2022) ⁴	Uji Aktivitas Antioksidan Serum Dari Ekstrak daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i> L Urban)	Invitro	Sediaan serum yang dihasilkan mempunyai daya antioksidan yang lemah, hasil IC50 sebesar 191,19 µg/ml.
3.	Dian et.al. (2022) ¹¹	Potensi <i>Nanostructured Lipid Carrier</i> (NLC) dengan Zat Aktif Ekstrak Herba Pegagan (<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.) sebagai Sediaan <i>Topical Gel</i> Anti-photoaging	<i>in silico</i> dengan <i>molecular docking</i>	Sistem NLC memiliki stabilitas, kelarutan, serta kemampuan absorpsi yang lebih baik. NLC dalam basis gel sangat potensial untuk digunakan sebagai upaya preventif maupun kuratif pada fotoaging.
4.	Darmalak sana <i>et al</i> , (2018) ¹²	Gerusan Daun Pegagan Mempercepat Kesembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih	In Vitro	Pemberian gerusan daun Pegagan mempercepat kesembuhan luka bakar derajat II pada tikus putih

No	Peneliti & Tahun	Judul	Metode Penelitian	Hasil
5.	Y.Lee et al, (2020) ⁹	<i>Inhibitory Effect of Centella asiatica Extract on DNCB-Induced Atopic Dermatitis in HaCaT Cells and BALB/c Mice</i>	Invitro dan Invivo	pemberian <i>Centella asiatica</i> pada kulit secara lokal dan oral memperbaiki peradangan kulit mirip <i>Atopic Dermatitis</i> yang diinduksi <i>Dinitro Chlorobenzene</i> (DNCB)
6.	Ruksiriwanich et al, (2020) ¹⁰	<i>Depigmented centella asiatica extraction by pretreated with supercritical carbon dioxide fluid for wound healing application</i>	Invitro	<i>Supercritical Carbondioxide</i> (scCO ₂) dari <i>Centella asiatica</i> dapat menghilangkan pigmen warna dari ekstrak dan memperbaiki penyembuhan luka



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Matriks Metalloproteinase 1 (MMP-1)*

MMP-1, yang juga dikenal sebagai Kolagenase interstisial, memiliki peran penting dalam degradasi komponen matriks ekstraseluler (ECM). MMP-1 adalah keluarga proteinase yang mengandung zinc yang mampu mendegradasi setiap jenis protein ECM. *Matriks Metalloproteinase (MMP)* merupakan faktor penting dalam fotoaging. Ekspresi MMP-1 dapat diinduksi oleh berbagai faktor, termasuk radiasi ultraviolet B (UVB), yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi MMP-1 pada fibroblas kulit manusia. Induksi ini merupakan bagian dari respons kulit terhadap kerusakan UVB tetapi juga dapat berkontribusi pada pemecahan Kolagen, yang mengarah pada penuaan kulit akibat paparan sinar matahari.¹³⁻¹⁴

MMP-1 disekresi oleh keratinosit dan fibroblas dermis sebagai respon terhadap berbagai stimulus, termasuk radiasi UV, stres oksidatif, dan sitokin. Enzim ini secara khusus bertanggung jawab untuk mendegradasi Kolagen tipe I, yang merupakan komponen utama dari ECM kulit. MMP-1 merupakan bagian dari subkelompok Kolagenase yang juga mencakup MMP-8 dan MMP-13, dan berperan penting dalam proses patofisiologis termasuk fotoaging, penyembuhan luka, inflamasi dan kanker. Paparan UV menginduksi produksi spesies oksigen reaktif (ROS) seperti radikal hidroksil (OH^-), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan oksigen tunggal ($^1\text{O}_2$), di dalam sel. ROS adalah molekul yang reaktif secara

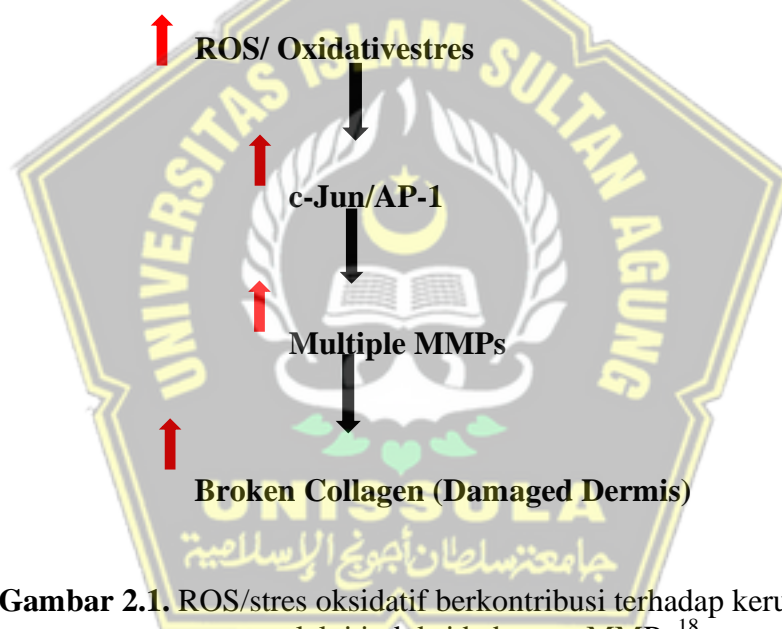
kimia dan mengandung oksigen, pembentukan ROS merupakan peristiwa awal yang memicu induksi MMP yang dimediasi oleh UVB. Peningkatan kadar ROS setelah paparan UVB dapat menyebabkan stres oksidatif seluler, yang mengaktifkan berbagai jalur sinyal intraseluler dan faktor transkripsi, seperti protein aktivator-1 (AP-1) dan faktor nuklir *kappa-light-chain-enhancer* dari sel B yang diaktifkan (NF- κ B). ROS ini berfungsi sebagai pembawa pesan sekunder yang mengaktifkan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), yang meliputi *Extracellular cell-Regulated Kinase* (ERK), K48, dan *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK). Aktivasi MAPK ini penting untuk merangsang ekspresi c-Fos dan c-Jun, yang merupakan komponen dari faktor transkripsi AP-1. AP-1 kemudian berikatan dengan promotor gen MMP dan meningkatkan ekspresi MMP, termasuk MMP-1, yang menyebabkan degradasi Kolagen dan elastin dalam ECM. Oleh karena itu, ROS tidak hanya menyebabkan kerusakan langsung pada komponen seluler melalui stres oksidatif, tetapi juga berkontribusi pada penuaan kulit dengan meningkatkan ekspresi dan aktivitas MMP-1, yang selanjutnya merusak ECM dan mengurangi produksi serta biosintesis Kolagen. Stres oksidatif yang dihasilkan dari paparan UVB juga dapat menyebabkan kerusakan genetik pada sel-sel kulit, termasuk keratinosit dan melanosit, yang berperan dalam pembentukan dan transfer pigmen.^{13,15}

Paparan UVB juga menyebabkan keratinosit mengeluarkan GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), yang memicu fibroblas dan merangsang ekspresi MMP-1, sehingga mendegradasi

Kolagen tipe I dan berkontribusi pada hilangnya elastisitas kulit. Oleh karena itu, pengembangan inhibitor MMP, termasuk penghambat MMP-1, dianggap sebagai strategi yang menjanjikan untuk terapi anti-aging dan pencegahan kerusakan kulit akibat sinar matahari.¹⁶

Penghambatan MMP-1 oleh ekstrak *Centella asiatica* dapat membantu mencegah degradasi Kolagen yang disebabkan oleh faktor-faktor seperti paparan UV, yang merupakan salah satu penyebab utama fotoaging.

17



Gambar 2.1. ROS/stres oksidatif berkontribusi terhadap kerusakan dermis melalui induksi beberapa MMP.¹⁸

Spesies oksigen reaktif (ROS) berperan dalam menyebabkan kerusakan pada dermis kulit dengan cara meningkatkan ekspresi berbagai jenis MMP. Peningkatan ROS, yang dapat terjadi akibat pengecilan ukuran fibroblas, mengaktifkan faktor transkripsi c-Jun/AP-1 yang selanjutnya meningkatkan produksi MMP- 1, hal ini berkontribusi pada kerusakan

dermis kulit yang terjadi seiring bertambahnya usia. Aktivitas AP-1 diatur oleh berbagai rangsangan termasuk ROS.¹⁹

ROS tidak hanya meningkatkan ekspresi MMP-1 melalui jalur transkripsi seperti protein aktivator-1 (AP-1), tetapi juga dapat menyebabkan kerusakan pada komponen sel, termasuk DNA. Kerusakan DNA dapat berkontribusi pada berbagai masalah kulit, termasuk fotoaging. Kerusakan DNA yang diinduksi oleh UVB dianggap sebagai salah satu peristiwa kunci yang memulai pelepasan MMP-1, yang menekankan pentingnya memahami mekanisme molekuler yang mendasari penuaan untuk mengembangkan bahan kosmetik potensial yang dapat memberikan perlindungan dari sinar matahari atau memperbaiki kerusakan yang diinduksi oleh UVB.^{16,17,19,20}

2.1.1. Metode Pemeriksaan MMP-1

Metode pemeriksaan untuk MMP-1 (*Matriks Metalloproteinase 1*) dapat dilakukan melalui beberapa metode, yaitu:

1. *Immunohistochemistry* (IHC)

IHC digunakan untuk mendeteksi dan memvisualisasikan lokalisasi MMP-1 dalam jaringan menggunakan antibodi spesifik. Teknik ini memungkinkan penilaian distribusi dan ekspresi MMP-1 pada tingkat jaringan. Sel yang positif ditandai dengan sitoplasma yang berwarna coklat.²¹

2. *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

RT-PCR digunakan untuk mengukur ekspresi mRNA MMP-1 dalam sampel jaringan atau sel. Teknik ini melibatkan konversi mRNA menjadi cDNA, yang kemudian diamplifikasi dan diukur secara real-time menggunakan probe fluorescence.²²

3. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

ELISA adalah metode kuantitatif yang digunakan untuk mengukur konsentrasi MMP-1 dalam serum, plasma, atau supernatan kultur sel. Metode ini menggunakan antibodi yang dilapisi pada piringan untuk menangkap MMP-1, diikuti dengan deteksi menggunakan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim.

4. *Western Blotting*

Teknik ini digunakan untuk mendeteksi protein spesifik dalam sampel jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap MMP-1. Protein dipisahkan berdasarkan berat molekul melalui elektroforesis gel poliakrilamida dan kemudian ditransfer ke membran untuk diinkubasi dengan antibodi.

5. *Zymography*

Zymography adalah teknik elektroforesis yang digunakan untuk mendeteksi aktifitas enzimatik protease seperti MMP-1. Gelatin atau substrat lain yang dapat dicerna oleh MMP dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida. Setelah elektroforesis, gel diinkubasi dalam kondisi yang memungkinkan MMP untuk

mencerna substrat, dan zona lisis terlihat sebagai pita jernih pada gel yang diwarnai.^{13,18}

2.2. Kolagen

Kolagen adalah protein struktural utama yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit, serta merupakan komponen terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit. Di dalam tubuh manusia, terdapat berbagai jenis molekul Kolagen, Kolagen tipe I dan Kolagen tipe III merupakan penyokong utama kulit. Kolagen kulit terdiri atas dua rantai alfa dasar, alfa-1 dan alfa-2, yang masing-masing terdiri atas lebih dari 1000 residu asam amino, dan rantai-rantai ini membentuk struktur triple helix yang sangat kuat. Biosintesis Kolagen dimulai dari sel fibroblast dan melibatkan proses yang kompleks, termasuk sintesis pre-pro-collagen α di ribosom retikulum endoplasma kasar (RER) dengan vitamin C sebagai kofaktor, yang kemudian diubah menjadi proKolagen dan akhirnya menjadi serat Kolagen yang tidak larut.²³

Kolagen memiliki beberapa fungsi penting pada kulit:

- a. Memberikan kekuatan dan struktur pada kulit.

Kolagen adalah elemen utama kulit yang memberikan kekuatan. Di dermis, sekitar 97,5% dari protein berserat adalah Kolagen, yang membantu menjaga struktur dan integritas kulit.

- b. Menjaga elastisitas dan kekenduran kulit.

Kolagen bertanggung jawab untuk menjaga elastisitas dan kekenduran kulit. Pada kulit muda, Kolagen tipe III membantu menjaga

kelembutan dan elastisitas kulit, sedangkan Kolagen tipe I yang lebih dominan pada kulit dewasa, memberikan kekuatan pada jaringan.

c. Menahan air

Kolagen berkontribusi pada kapasitas kulit untuk menahan air, yang penting untuk menjaga hidrasi dan tampilan kulit yang sehat.

d. Proses penyembuhan

Kolagen juga terlibat dalam proses penyembuhan luka, di mana ia membantu dalam pembentukan jaringan parut baru dan pemulihan integritas kulit.

e. Dukungan mekanis

Kolagen bekerja bersama dengan protein lain seperti elastin dan glikosaminoglikan (GAGs) untuk memberikan dukungan mekanis dan mempertahankan struktur kulit yang sehat.

Kerusakan atau degradasi Kolagen, yang dapat terjadi karena penuaan atau paparan radiasi UV, menyebabkan hilangnya elastisitas dan kekuatan kulit, yang berujung pada pembentukan keriput dan tanda-tanda penuaan lainnya.^{23,24}

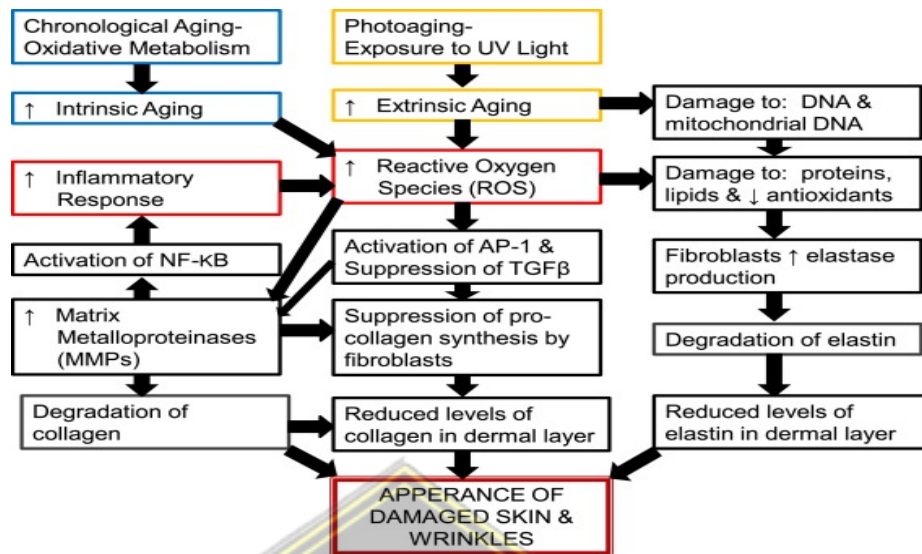
Paparan sinar UVB dari matahari dapat merusak Kolagen dalam kulit, yang merupakan salah satu faktor utama yang menyebabkan fotoaging atau penuaan kulit ekstrinsik. Ketika kulit terpapar sinar UVB, ini dapat menyebabkan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) yang mengakibatkan kerusakan pada Kolagen melalui aktivasi jalur sinyal transduksi yang mengarah pada peningkatan ekspresi *Matriks*

Metalloproteinase-1 (MMP-1), enzim yang berperan untuk degradasi Kolagen. Selain itu, aktivasi faktor transkripsi seperti AP-1 yang diinduksi oleh UVB dapat menghambat efek transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF- β) yang berperan dalam produksi Kolagen, sehingga mengurangi sintesis Kolagen baru. Dampak dari kerusakan Kolagen ini termasuk penurunan kekuatan dan elastisitas kulit, yang menyebabkan pembentukan keriput, penipisan kulit, dan perubahan tekstur kulit lainnya yang terkait dengan fotoaging.²⁵ Untuk melawan efek negatif ROS, tubuh menggunakan sistem pertahanan antioksidan yang meliputi enzim seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase, serta molekul antioksidan kecil seperti vitamin C dan E. Antioksidan ini dapat menetralkan ROS sebelum mereka menyebabkan kerusakan yang signifikan. Vitamin C ini terdapat dalam salah satu kandungan dalam Pegagan (*Centella asiatica*) yang berfungsi sebagai antioksidan melawan fotoaging akibat paparan UVB.²⁶

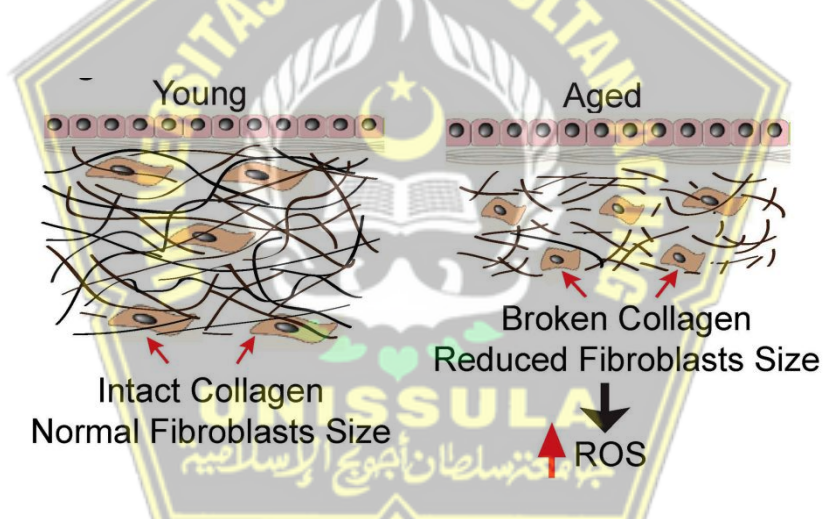
Kolagen dapat terpengaruh oleh kerusakan DNA yang disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk paparan sinar ultraviolet (UV), khususnya UVB. Paparan sinar UVB dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA, termasuk DNA mitokondria (mtDNA) dan DNA inti. Ketika DNA menyerap foton dari UVB, terjadi penyusunan ulang nukleotida yang merusak DNA. Meskipun DNA dapat diperbaiki melalui mekanisme seperti eksisi nukleotida, pada kondisi defisiensi protein atau faktor lain, kerusakan DNA tetap dapat terjadi dan menyebabkan penuaan dini. Kerusakan DNA

ini juga berdampak pada fungsi seluler, termasuk pada sel fibroblas di dermis yang bertanggung jawab atas produksi Kolagen. Dengan adanya gangguan pada perbaikan DNA, terutama pada lansia, respons perbaikan DNA terhadap stres oksidatif akut lebih rendah dibandingkan pada usia muda. Hal ini dapat menyebabkan ketidakstabilan kromosom, perkembangan sel terhenti, apoptosis, dan dermatitis kronik yang disebabkan oleh stres oksidatif.²³ Selain itu, paparan UVB meningkatkan produksi ROS di lapisan dermis, yang memicu reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1. AP-1 ini menstimulasi proses transkripsi enzim *Matrix Metalloproteinase* (MMP) yang berperan dalam degradasi Kolagen.²⁷

Pemeriksaan histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan *toluidine blue* menunjukkan, kulit muda memiliki fiber bundles tebal dengan sedikit rongga antar serat Kolagen, sedangkan di kulit tua rongga serta serat tidak beraturan dan tipis. Gambaran ini menunjukkan degradasi struktur Kolagen yang terjadi seiring bertambahnya usia.²³



Gambar 2.2. Fotoaging Menyebabkan Penurunan Level Kolagen Pada Dermis²⁸



Gambar 2.3. Kolagen muda dan Kolagen yang mengalami aging akibat paparan ROS, terjadi pengurangan ukuran fibroblast.¹⁸

2.2.1. Metode Pemeriksaan Kolagen

Untuk menilai Kolagen, beberapa metode pemeriksaan yang dapat digunakan adalah:

1. Pemeriksaan Histopatologis

Pewarnaan khusus seperti Trichrome Masson atau Sirius Red yang secara spesifik mengikat Kolagen dan memberikan

warna merah pada serat Kolagen di tengah latar kuning pucat. Pada pewarnaan histopatologi dengan Sirius Red, peningkatan jumlah Kolagen biasanya ditunjukkan oleh peningkatan kepadatan atau intensitas warna merah pada area yang mengandung Kolagen. Sirius Red adalah pewarna anionik yang memiliki afinitas tinggi untuk mengikat serat Kolagen, dan ketika diikat, serat Kolagen akan tampak merah di bawah mikroskop cahaya.^{14,21}

2. Immunohistokimia (IHC)

Menggunakan antibodi yang spesifik terhadap berbagai jenis Kolagen untuk mendeteksi dan memvisualisasikan lokalisasi Kolagen dalam jaringan.

3. Mikroskopi Konfokal

Dapat digunakan bersama dengan pelabelan fluoresen untuk Kolagen, memungkinkan visualisasi Kolagen pada tingkat mikroskopis dengan resolusi tinggi.

4. Analisis Densitometri

Mengukur intensitas warna atau fluoresensi setelah pewarnaan atau pelabelan Kolagen, yang berkorelasi dengan jumlah Kolagen dalam sampel.

5. Analisis Histomorfometri

Pengukuran dan analisis gambar histologis untuk menentukan jumlah dan distribusi Kolagen dalam jaringan.

6. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Mengukur konsentrasi Kolagen dalam serum, plasma, atau supernatan kultur sel dengan menggunakan antibodi yang spesifik untuk Kolagen.

7. *Western Blotting*

Mendeteksi dan mengukur protein Kolagen spesifik dalam sampel jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap Kolagen.

8. Analisis Biomekanik

Mengukur sifat mekanik jaringan yang mengandung Kolagen, seperti kekuatan tarik dan elastisitas, yang dapat memberikan informasi tentang kualitas dan kuantitas Kolagen.²⁹⁻³⁰

2.3. Fotoaging Akibat Paparan UVB

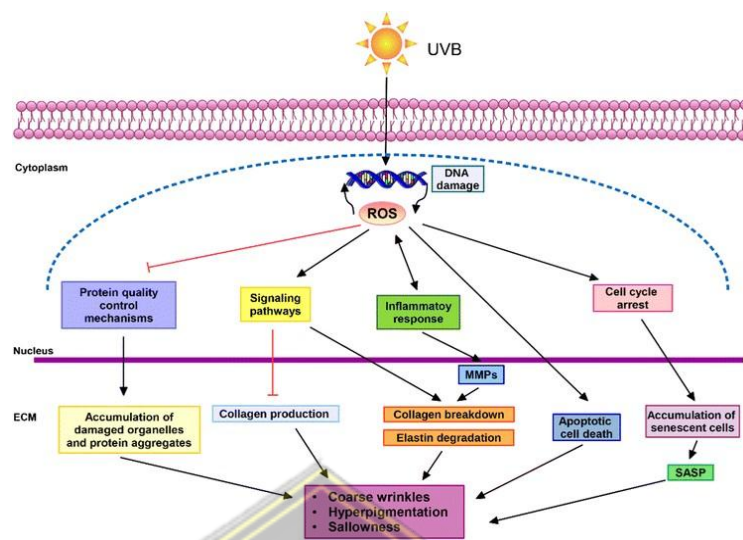
Fotoaging adalah proses penuaan kulit yang dipercepat akibat paparan sinar ultraviolet (UV), terutama sinar UVB, dari matahari.³¹ Fotoaging ditandai dengan sejumlah perubahan pada kulit, seperti:

- a. Kerusakan Kolagen, paparan sinar UVB meningkatkan produksi radikal bebas dan aktivitas Matriks Metalloproteinase (MMP), enzim yang mendegradasi Kolagen dan elastin, menyebabkan penurunan Kolagen dan elastin yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit.
- b. Kerusakan DNA, UVB dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA sel, termasuk DNA mitokondria dan DNA inti, yang dapat

mengganggu fungsi sel dan proses penyembuhan. Paparan UVB pada kulit dapat menyebabkan berbagai efek negatif termasuk kerusakan DNA keratinosit yang memicu pelepasan mediator respons inflamasi seperti sitokin IL-1 α , IL-6, dan TNF- α .¹⁶

- c. Peningkatan radikal bebas, paparan UVB dapat meningkatkan produksi radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif dan meningkatnya status inflamasi yang berujung pada kerusakan sel.
- d. Perubahan pigmentasi, fotoaging seringkali menyebabkan perubahan pigmentasi seperti *lentigo solaris* peningkatan risiko terjadinya *actinic keratosis*.
- e. Kerutan dan tekstur kulit, kulit menjadi lebih tipis, kehilangan kekenduran, dan munculnya kerutan halus serta elastosis aktinik.³²

Fotoaging merupakan bagian dari penuaan kulit, tergolong dalam penuaan ekstrinsik. Paparan sinar UV baik UVA maupun UVB merupakan penyebab utama terjadinya fotoaging.¹³ UVB adalah komponen dari sinar ultraviolet yang mencapai permukaan bumi, yang terdiri dari panjang gelombang 280 hingga 320 nanometer. UVB tidak menembus atmosfer bumi sebanyak UVA dan sebagian besar diserap oleh lapisan ozon. Namun, UVB yang mencapai permukaan bumi memiliki energi yang lebih tinggi dibandingkan UVA dan dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA sel kulit, menyebabkan peradangan, dan berkontribusi pada proses penuaan kulit serta peningkatan risiko kanker kulit.³³



Gambar 2.4. Mekanisme UVB menginduksi skin aging³⁴

Paparan sinar UVB akan memicu terjadinya kerusakan DNA dan pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (ROS). Hal ini akan mengakibatkan fotoaging melalui aktivasi jalur pensinyalan dari inflamasi dan modulasi komponen remodeling matriks ekstraseluler (ECM) yaitu Protein, Kolagen dan *Matriks Metalloproteinase* (MMP). Peningkatan MMP yang dipicu sinar UVB kemudian menyebabkan degradasi ECM dan penurunan produksi Kolagen. Peningkatan aktifitas enzim seperti Kolagenase, Elastase dan Hyaluronidase dipicu oleh tingginya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan saat kulit terpapar sinar Ultraviolet (UV).¹³

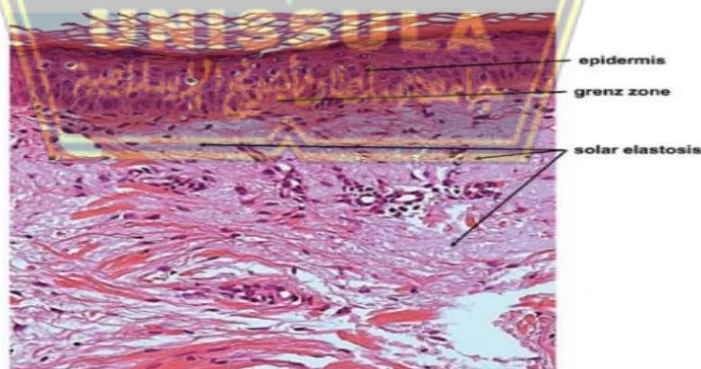
Paparan UVB dapat menyebabkan hiperpigmentasi dengan merangsang produksi melanin, pigmen yang memberikan warna pada kulit. Ketika kulit terpapar UVB, sel melanosit di epidermis diaktifkan untuk memproduksi dan mendistribusikan melanin sebagai respons terhadap kerusakan DNA yang disebabkan oleh radiasi UV. Melanin bertindak sebagai pelindung alami dengan menyerap dan menyebarluaskan energi UV,

sehingga mengurangi risiko kerusakan lebih lanjut pada DNA sel kulit. Hiperpigmentasi yang dihasilkan dapat berupa peningkatan warna yang seragam atau bercak-bercak gelap pada kulit, yang sering disebut sebagai bintik-bintik penuaan atau *lentigo solaris*. Kulit yang gelap lebih tahan terhadap kerusakan kulit akibat paparan sinar UV, sehingga manifestasi penuaan kulit lebih ringan dan terjadi lebih lambat 10 hingga 20 tahun dibandingkan dengan kulit yang lebih terang. Pada kulit dengan tipe Fitzpatrick III dan IV, dispigmentasi atau perubahan pigmen kulit merupakan gambaran utama dari fotoaging. Klasifikasi fotoaging pertama kali dilakukan oleh Glogau pada tahun 1996. Berdasarkan klasifikasi dari Glogau, terdapat 4 tipe fotoaging mulai dari tipe I hingga tipe IV. Glogau tipe I (mild) yakni fotoaging fase awal dimana biasanya terjadi pada usia 20 hingga 30 tahun dan tidak ditemukan adanya keriput (*wrinkle*). Pada Glogau tipe II (moderate) sudah mulai ditemukan adanya tanda-tanda fotoaging yakni keriput pada gerakan ekspresi wajah. Biasanya Glogau tipe II ini ditemukan pada usia 30 hingga 40 tahun. Glogau tipe III (*advanced*) menunjukkan adanya fotoaging lebih lanjut, biasanya ditemukan pada usia 50 tahun, ditandai dengan adanya keriput pada saat istirahat (*resting wrinkle*). Gambaran fotoaging yang berat digolongkan pada Glogau tipe IV (*severe*) yang biasanya ditemukan pada usia 60 tahun dan ditandai dengan banyaknya kerutan.²⁷

Pekerja lapangan seperti petani dan nelayan, yang sering terpapar sinar matahari, memiliki risiko yang lebih tinggi untuk mengalami fotoaging

dibandingkan dengan pekerja kantoran. Area kulit yang sering terpapar sinar UV, seperti wajah, leher, dada bagian atas, tangan, dan lengan bagian bawah, adalah area predileksi terjadinya fotoaging.²⁷

Perubahan histopatologi kulit pada fotoaging, epidermis dapat mengalami hiperplasia maupun atrofi. Pada fotoaging lapisan dermis mengalami perubahan seperti hilangnya papila dermis, penebalan membran basal, peningkatan jumlah dan distribusi melanosit serta melanosom yang tidak teratur, *keratinosit atipikal*, *solar elastosis*, fibroblas kusut dan hiperplastik, perubahan bentuk serat Kolagen, penurunan jumlah Kolagen, pelebaran mikrovaskuler dan infiltrasi sel inflamasi yang berlimpah. *Solar elastosis* merupakan degenerasi basofilik dari serat elastotik dalam dermis. *Solar elastosis* dipisahkan dari epidermis oleh lapisan serabut Kolagen yang tampak normal (zona grenz) dengan serat Kolagen yang tersusun horizontal.¹³

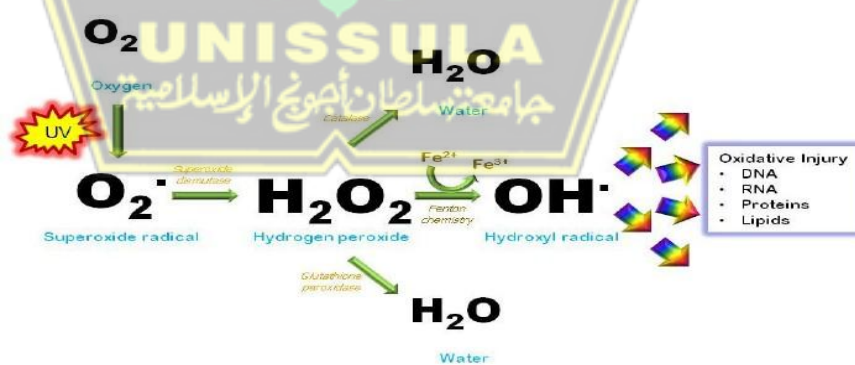


Gambar 2.5. Gambaran histologi kulit yang mengalami fotoaging.¹³

2.3.1. Radikal Bebas Akibat Paparan UVB

Paparan UVB dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas dalam kulit. Paparan UV (UVB) menghasilkan radikal bebas

oksidatif. Foton UV berinteraksi dengan oksigen atom untuk mendorong pembentukan turunan radikal bebas seperti superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), Oksigen singlet (1O_2) dan radikal hidroksil (OH^-) yang sangat reaktif. Radikal bebas menyerang makromolekul seperti protein, lipid, RNA dan DNA, mengubah strukturnya dan mengganggu fungsinya. Radikal bebas dapat menyebabkan peroksidasi lipid yang mengganggu integritas membran dan berpotensi menyebabkan kematian sel. Radikal bebas menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, yang merupakan salah satu mekanisme utama di balik efek mutagenik dan karsinogenik dari paparan UVB. Enzim detoksifikasi dan proteksi seperti *superoksida dismutase*, katalase dan *glutathione peroksidase* mendetoksifikasi dan mengurangi level stres oksidatif di tingkat sel.³⁵



Gambar 2.6. Radikal bebas akibat paparan UVB³⁶

2.3.1.1. Radical hydroxyl (OH^-) dan DNA damage

Hidroksil radikal (OH^-) merupakan spesies yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan luas pada

DNA, merupakan faktor penting dalam kerusakan seluler yang terkait dengan stres oksidatif. Radikal hidroksil dapat menyerang DNA dan menghasilkan berbagai lesi yang bersifat mutagenik dan sitotoksik, yang memainkan peran kunci dalam proses karsinogenik. Hidroksil radikal memberikan kontribusi signifikan terhadap kerusakan DNA oksidatif.

Hidroksil radikal (OH^-) menyerang langsung pada komponen-komponen DNA, termasuk basa purin dan pirimidin serta gugus deoksiribosa, menyebabkan kerusakan yang luas pada DNA meliputi perubahan kimia pada basa, pemutusan ikatan gula-fosfat yang mengakibatkan patahnya untai DNA.³⁷

2.3.1.2. *Radical superoxide* (O_2^-) dan *DNA damage*

Superoxide merupakan bentuk reaktif dari oksigen (O_2^-), dapat menyebabkan kerusakan DNA melalui beberapa mekanisme:

1. Superoksida dapat berinteraksi dengan molekul lain untuk membentuk spesies oksigen reaktif (ROS) yang lebih reaktif, seperti *Hidrogen peroksida* (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^-), yang dapat menyerang dan merusak basa DNA serta tulang punggung gula-fosfat.

2. Superoksida secara langsung merusak komponen mitokondria, termasuk DNA mitokondria (mtDNA), yang lebih rentan terhadap kerusakan oksidatif karena dekatnya dengan rantai transport elektron, tempat superoksida dihasilkan. Kerusakan mtDNA ini dapat menyebabkan mutasi dan disfungsi mitokondria, yang selanjutnya dapat menyebabkan penurunan produksi ATP dan peningkatan produksi ROS, sehingga menciptakan lingkaran setan yang memperburuk kerusakan sel. Oleh karena itu, superoksida dan ROS lainnya memainkan peran penting dalam patogenesis berbagai penyakit yang terkait dengan stres oksidatif dan kerusakan DNA.³⁶

2.3.1.3. Hidrogen peroksida (H_2O_2) dan *DNA damage*

Hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah salah satu spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat terbentuk sebagai produk sampingan dari metabolisme normal sel, khususnya melalui aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD) yang mengkatalisasi dismutasi Superoksida menjadi H_2O_2 dan oksigen (O_2). Meskipun H_2O_2 kurang reaktif dibandingkan dengan radikal bebas lain seperti Radikal hidroksil (OH^-), ia tetap dapat menyebabkan kerusakan pada DNA jika tidak

diatur dengan baik oleh sistem antioksidan lainnya seperti katalase dan peroksidase.

Kerusakan DNA yang diinduksi oleh H₂O₂ dapat memicu respons perbaikan DNA, tetapi jika kerusakan tersebut terlalu luas atau sistem perbaikan tidak efisien, hal ini dapat menyebabkan mutasi, apoptosis, atau transformasi sel menjadi kanker. Oleh karena itu, pengaturan ketat terhadap H₂O₂ dan ROS lainnya sangat penting untuk menjaga integritas genom dan mencegah kerusakan DNA yang dapat menyebabkan berbagai penyakit.³⁶

2.3.1.4. Oksigen singlet (¹O₂) dan *DNA damage*

Oksigen singlet (¹O₂) adalah bentuk oksigen yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai komponen sel, termasuk DNA. Kondisi paparan UVB yang berlebihan dapat meningkatkan produksi ¹O₂ dan spesies oksigen reaktif (ROS) lainnya, yang dapat mengakibatkan stres oksidatif.³⁸

Mekanisme fotoaging yang disebabkan oleh paparan UVB dan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) melibatkan beberapa proses biokimia dan molekuler yang saling terkait. ROS secara langsung mengaktifkan reseptor permukaan sel untuk sitokin inflamatori seperti *Interleukin-1* (IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α).

Sitokin-sitokin ini berperan dalam memicu peradangan dan merangsang keratinosit serta fibroblas dermal untuk menghasilkan matriks metalloproteinase (MMP).³⁹

2.3.2. Pengaruh Radikal Bebas Akibat Paparan UVB terhadap Ekspresi Gen

Radikal bebas dapat mempengaruhi ekspresi gen dengan berbagai cara. Salah satu mekanisme utama adalah melalui kerusakan DNA yang disebabkan oleh stres oksidatif, yang dapat mengubah regulasi genetik dan ekspresi gen. Radikal bebas dapat menyerang basa DNA, menyebabkan mutasi, dan memicu perbaikan DNA yang jika tidak sempurna, dapat mengubah pola ekspresi gen.

40

Selain itu, radikal bebas dapat mengaktifasi atau menekan faktor transkripsi tertentu, yang pada gilirannya dapat mengubah ekspresi gen yang diatur oleh faktor transkripsi tersebut. Misalnya, faktor transkripsi seperti NF- κ B dan AP-1, yang berperan dalam proses inflamasi dan respons stres sel, dapat diaktifkan oleh stres oksidatif yang diinduksi oleh radikal bebas.

Stres oksidatif juga dapat mempengaruhi sinyal transduksi yang mengatur ekspresi gen. Misalnya, jalur sinyal MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) dapat diaktifkan oleh radikal bebas, yang dapat mempengaruhi ekspresi gen yang terkait dengan

proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis yang berkontribusi pada proses fotoaging.

Peningkatan ROS juga menyebabkan kerusakan mitokondria dan respons kerusakan DNA berbasis telomer, yang berkontribusi pada penurunan integritas struktural kulit. ROS dapat mengubah Kolagen dan elastin, dua komponen utama yang memberikan elastisitas dan kekencangan pada kulit, sehingga menyebabkan penipisan epidermis dan penurunan elastisitas kulit. Mekanisme fotoaging melibatkan interaksi kompleks antara kerusakan DNA, stres oksidatif, dan aktivasi jalur inflamasi yang mengakibatkan degradasi ECM dan penurunan produksi Kolagen, yang pada akhirnya menyebabkan perubahan klinis pada kulit seperti keriput, penipisan kulit, dan perubahan vaskuler.

Radikal bebas dapat mempengaruhi ekspresi gen melalui modifikasi epigenetik. Misalnya, stres oksidatif dapat meningkatkan metilasi DNA, yang dapat mengubah ekspresi gen dengan menghambat aktivasi transkripsi. Radikal bebas juga dapat mempengaruhi ekspresi gen melalui perubahan pada histon dan kromatin, yang mempengaruhi aksesibilitas DNA untuk faktor transkripsi dan mesin transkripsi. Radikal bebas dapat mempengaruhi ekspresi gen baik secara langsung melalui kerusakan DNA maupun secara tidak langsung melalui perubahan epigenetik

dan regulasi faktor transkripsi, yang semuanya dapat berkontribusi pada proses penuaan dan pengembangan penyakit terkait usia.⁴¹

Secara keseluruhan, radikal bebas memiliki potensi untuk mempengaruhi ekspresi gen secara signifikan, yang dapat berdampak pada berbagai proses biologis dan patologis dalam organisme.

Pencegahan dan penanganan fotoaging dengan bahan-bahan alami dengan sifat antioksidan seperti ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) dapat membantu dalam memperbaiki fotoaging akibat paparan UVB.³³

2.4. Pegagan (*Centella asiatica*)

2.4.1. Definisi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*), adalah tanaman tropis yang termasuk dalam keluarga Apiaceae.⁴² *Centella asiatica* telah digunakan secara luas dalam pengobatan tradisional Ayurveda dan Tiongkok selama berabad-abad untuk mengobati berbagai penyakit kulit, termasuk infeksi bakteri, psoriasis, skleroderma, ulkus, kusta, dan juga peradangan kulit akibat luka bakar. Selain itu, tanaman ini juga dikonsumsi sebagai minuman kesehatan dan digunakan sebagai sayuran dalam berbagai masakan dan resep makanan tradisional di negara-negara Asia.⁴³

Dalam literatur ilmiah, tanaman ini juga dikenal dengan sinonim *Hydrocotyle asiatica* Linn. Nama umum lainnya adalah

Gotu Kola dan banyak tumbuh di daerah tropis seperti Asia, Oseania, Afrika dan Amerika. Pegagan juga mempunyai nama yang berbeda-beda tergantung dari tempat asalnya. Pegagan di Jawa Barat disebut *antan*. Di Jakarta dan Aceh namanya *Pegagan*, masyarakat Sumatera menyebutnya dengan *tanaman kaki kuda*. Masih banyak lagi nama Pegagan lokal seperti *kori-kori* di Halmahera, *pegagodi* di daerah Minangkabau, *dogauke* atau *sandan* di wilayah Papua, dan *bebile* di daerah Lombok. Nama Pegagan di beberapa negara antara lain *Pegagan* di Sri Lanka, *takip-kohot* di Filipina, *sen wort* di Inggris, *brahma butu* di India, *sen wort* di Inggris dan di Cina dikenal sebagai *ji xue cao*, sedangkan di Perancis dikenal dengan nama *bevilaque*, *hydrocote d'Asie*, atau *cotyiole asiaticu*.⁴²

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman yang tersebar luas di berbagai wilayah di Indonesia, terutama di daerah yang memiliki iklim tropis dan lembap. Tanaman ini dapat tumbuh di dataran rendah hingga dataran tinggi dan sering ditemukan di tepi sungai, sawah, kebun, dan tempat-tempat yang teduh. Karena kemampuannya beradaptasi dengan berbagai jenis tanah dan kondisi lingkungan, Pegagan mudah ditemukan di seluruh wilayah Indonesia. Tanaman pegagan dapat tumbuh baik dengan intensitas cahaya 30–40 %, sehingga dapat dikembangkan sebagai tanaman sela musiman maupun tahunan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan pada musim kemarau juga menghasilkan informasi bahwa tanaman pegagan

dapat tumbuh dengan baik pada tingkat naungan 25%, bahkan pada naungan 75% juga masih menunjukkan pertumbuhan yang baik, meskipun tetap terjadi penurunan produksi pegagan. Kandungan senyawa utama triterpenoid terbanyak pada pegagan di bawah naungan 25%. Pertumbuhan suatu tanaman di bawah kondisi yang kurang optimum menunjukkan penurunan kemampuan tumbuh dan produksinya.⁴⁴

2.4.2. Taksonomi Pegagan (*Centella asiatica*)

Taksonomi *Centella asiatica* adalah sebagai berikut :

1. *Kingdom* : *Eukaryota*
2. *Subkingdom* : *Embryophyta*
3. *Division* : *Spermatophyta*
4. *Subdivision* : *Angiospermae*
5. *Class* : *Dicotyledoneae*
6. *Subclass* : *Rosidae*
7. *Superorder* : *Aralianae*
8. *Order* : *Araliales (Umbelliflorae)*
9. *Family* : *Apiaceae atau Umbelliferae*
10. *Subfamily* : *Hydrocotyle*
11. *Genus* : *Centella*
12. *Species* : *Centella asiatica*⁴⁵

2.4.3. Morfologi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan memiliki daun berbentuk bulat hingga reniform (bentuk ginjal) dengan tepi yang rata atau sedikit bergelombang. Daunnya terhubung dengan tangkai panjang (petioles) yang bisa mencapai panjang 2-6 cm. Daunnya memiliki ujung yang bulat dan memberikan tekstur yang halus, biasanya berukuran sekitar 20 cm.

Bunga Pegagan kecil, berdiameter kurang dari 3 mm, dan muncul dalam kelompok yang disebut umbel. Bunga Pegagan bisa berwarna putih, merah, pink, atau ungu.⁴²

Buah Pegagan kecil, terkompresi, dan memiliki 7 hingga 9 alur, dengan panjang sekitar 8 mm. *Mericarps*-nya bulat di bagian atas dan melengkung, sementara biji lateralnya terkompresi.⁴⁶

Akar Pegagan tumbuh vertikal ke bawah dan berwarna hijau. Sistem akarnya memungkinkan Pegagan untuk menyebar dan tumbuh cepat di lingkungan yang lembap.

Pegagan biasanya tumbuh dengan ketinggian antara 15-25 cm, tergolong sebagai tanaman herba yang rendah.



Gambar 2.7. Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)⁴⁷

2.4.4. Manfaat Pegagan (*Centella asiatica*) dalam Mengatasi fotoaging.

Centella asiatica memiliki manfaat dalam mengatasi fotoaging karena kandungan antioksidan yang tinggi, dapat melindungi kulit dari kerusakan akibat paparan sinar UV. Tanaman ini juga mendorong sintesis Kolagen, yang penting untuk menjaga elastisitas dan kekuatan kulit, serta mengurangi degradasi matriks ekstraseluler yang sering terjadi akibat fotoaging. Selain itu, *Centella asiatica* telah dilaporkan memiliki aktivitas perlindungan terhadap sinar UV, yang dapat membantu mencegah kerusakan kulit lebih lanjut yang disebabkan oleh paparan sinar matahari.

Pegagan merupakan salah satu tanaman herbal yang digunakan dalam perawatan dan pengobatan penyakit dan lesi kulit. Ekstrak daun Pegagan juga dapat digunakan sebagai bahan kosmetik.

Metabolit sekunder yang diisolasi dari *Centella asiatica* yaitu Triterpen tipe ursane, Triterpen tipe oleanane, Glikosida triterpen tipe ursane, Glikosida triterpen tipe oleanane, Glikosida triterpen tipe dammarane, Steroid, Glikosida steroid, Flavonoid, Poliasetilen, Asam fenolik, Thankunside, Isothankunside, Brahmie acid, Brahmioside, Centellose, Madasiatic acid, Meso-inositol, Carotenoids, Garam kalium, Garam natrium, Garam kalsium, Zat besi, Minyak atsiri, Fosfor, Veralin, Tanin, Pektin, Musin, Resin, Gula, Vitamin B, sedikit Vitamin C, Kalsium oksalat, Amygdalin. Metabolit *Centella asiatica* yang paling menonjol adalah empat

triterpen tipe ursane, yaitu, Asam asiatic, Asam madecasic, Asiatikosida dan Madekasosid.^{48,49}

Senyawa aktif dari Pegagan yang memiliki aktivitas pada kulit adalah Asiatikosida, Madekasosid, Asam asiatica dan Asam madecasic yang bersifat antiinflamasi terhadap paparan sinar UVB pada kejadian fotoaging.⁴²

Asiatikosida dapat menghambat mediator proinflamasi, termasuk kadar *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) dan *Interleukin-6* (IL-6), ekspresi protein *Cyclooxygenase-2* (COX-2), dan produksi *Prostaglandin E2* (PGE2), serta aktivitas *Myeloperoxidase* hati. Selain itu, asiatikosida juga dapat meningkatkan tingkat antiinflamasi IL-10 dalam serum dan mengatur ekspresi *heme oxygenase-1* (HO-1), enzim yang melindungi hati.

Ekstrak daun Pegagan telah terbukti memiliki efek penyembuhan luka dalam beberapa penelitian, dengan senyawa triterpen dan campuran triterpenoid seperti asam asiatic, asam madecasic, asiatikosida, dan madekasosid yang merupakan komponen utama Pegagan untuk penyembuhan luka pada uji in vitro dan in vivo.⁵⁰

Selain itu, ekstrak daun Pegagan memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti *Terpenoid*, *Polyphenols*, *Flavonoid*, *Carotene*, *Tannin* dan Vitamin C yang memiliki sifat antioksidan. Ekstrak

etanol 50% dari *Centella asiatica* mengandung jumlah Polifenol, Flavonoid, Karoten, dan Tanin dalam jumlah yang jauh lebih tinggi, tetapi jumlah Vitamin C paling rendah.⁵¹ Antioksidan – antioksidan ini dapat melindungi kulit dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas, termasuk yang dihasilkan oleh paparan sinar UV yang berlebihan, yang merupakan salah satu penyebab utama fotoaging.^{52,53}

2.4.4.1. Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*) dalam Mengatasi

Fotoaging Akibat Paparan UVB

Pegagan mempunyai berbagai kandungan yang berkhasiat sebagai antiaging pada kulit, khususnya dalam mengatasi fotoaging

1. *Asiaticoside*

Asiaticoside adalah salah satu senyawa bioaktif yang ditemukan dalam *Centella asiatica*. Ini adalah triterpenoid pentasiklik yang telah banyak diteliti karena berbagai sifat biologisnya, termasuk penyembuhan luka, antiinflamasi, dan efek neuroprotektif. *Asiaticoside* meningkatkan migrasi, perlekatan, dan pertumbuhan sel kulit, yang sangat penting untuk proses penyembuhan luka. Selain itu, *Asiaticoside* dilaporkan meningkatkan kadar antioksidan pada luka yang sedang sembuh dan lebih lanjut berkontribusi pada potensi terapeutiknya.

Asiaticoside juga dilaporkan meningkatkan sintesis Kolagen pada pasien striae.^{43,54-55}

Asiaticoside juga berperan mengurangi kerusakan DNA, terutama pada cedera yang diinduksi oleh radiasi. Studi in vitro menunjukkan bahwa pemberian *Asiaticoside* dapat secara signifikan memperbaiki kerusakan DNA rantai ganda (DSBs) dan apoptosis pada fibroblas. Selain itu, kemampuan *Asiaticoside* untuk memulihkan tingkat kapasitas antioksidan total serum (T-AOC) yang terpengaruh oleh radiasi menunjukkan bahwa *Asiaticoside* bisa bertindak sebagai pelindung radiasi, berpotensi melalui sifat antioksidannya. Peran *Asiaticoside* terhadap apoptosis sel menunjukkan keterlibatannya dalam proses perbaikan kerusakan DNA.⁵⁶

2. *Madecassoside*

Madecassoside merupakan salah satu senyawa bioaktif dari *Centella asiatica* yang telah diteliti secara ekstensif dan dilaporkan memiliki berbagai sifat biologis, termasuk penyembuhan luka, penyembuhan bekas luka, mempromosikan pertumbuhan sel, neuroprotektif, kardioprotektif, antioksidatif, dan antiinflamasi.⁴³ *Madecassoside* secara signifikan

menghambat sitokin pro-inflamasi IL-1 β , TLR2, dan translokasi nuklir NF- κ B pada sel monositik manusia THP-1.⁵⁷

Madecassoside berperan dalam perlindungan terhadap kerusakan DNA. *Madecassoside* dapat melindungi DNA dari kerusakan yang disebabkan oleh paparan sinar ultraviolet, dengan menurunkan fotodimerisasi timin lebih dari 28% (P<0.05). Selain itu, *Madecassoside* juga dapat menginduksi ekspresi Kolagen dengan mengaktifkan jalur pensinyalan SMAD, yang menyebabkan proliferasi fibroblast dan peningkatan kadar *hydroxyproline*, mengakibatkan peningkatan epitelisasi.⁵⁸

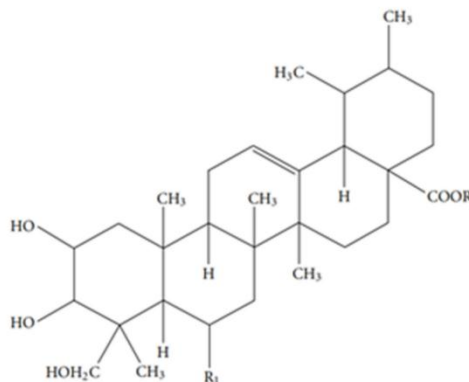
3. *Asiatic acid*

Asiatic acid adalah salah satu komponen aktif yang terdapat dalam tanaman *Centella asiatica* yang memiliki berbagai sifat farmakologis, termasuk antiinflamasi dan antioksidan. *Asiatic acid* juga memiliki efek neuroprotektif dan dapat meningkatkan fungsi kognitif. Selain itu, penelitian telah menunjukkan bahwa *Asiatic acid* dapat menginduksi apoptosis dalam sel kanker, menunjukkan potensi sebagai agen antikanker.^{43,59}

Asiatic acid menunjukkan aktivitas antikanker pada berbagai jenis sel kanker, *Asiatic acid* menginduksi apoptosis dan penangkapan siklus sel melalui aktivasi jalur ekstrinsik dan intrinsik apoptosis, yang melibatkan perubahan potensial membran mitokondria, peningkatan aktivasi kaspase 3, 8, dan 9. Salah satu ciri khas apoptosis adalah fragmentasi DNA, dan pengobatan dengan *Asiatic acid* telah dikaitkan dengan proses ini.⁶⁰

4. *Madecassic acid*

Madecassic acid adalah salah satu komponen aktif yang terdapat dalam tanaman *Centella asiatica* yang memiliki berbagai sifat farmakologis, termasuk anti-inflamasi, antioksidan, dan kemampuan untuk mempromosikan penyembuhan luka. *Madecassic acid* juga telah ditunjukkan untuk memiliki efek neuroprotektif dan dapat meningkatkan fungsi kognitif. Selain itu, penelitian telah menunjukkan bahwa *madecassic acid* dapat menginduksi apoptosis dalam sel kanker, menunjukkan potensi sebagai agen antikanker.⁴³



Madecassoside	R ₁ = OH	R ₂ = Glu-Glu-Rha
Asiaticoside	R ₁ = H	R ₂ = Glu-Glu-Rha
Madecassic acid	R ₁ = OH	R ₂ = H
Asiatic acid	R ₁ = H	R ₂ = H

Gambar 2.8. Struktur kimia Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid dan Asiatic acid.⁴³

5. Polyphenols

Senyawa fenolik yang terkandung dalam herba Pegagan berfungsi sebagai antioksidan alami. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel dapat dihambat. Aktivitas antioksidan dari senyawa fenol terutama karena adanya reaksi reduksi oksidasi yang berperan penting dalam menyerap dan menetralkan radikal bebas, mengurangi oksigen singlet dan triplet serta dekomposisi peroksida.⁴

Aktivitas antioksidan senyawa *Polyphenol* dilakukan dengan cara menghambat enzim seperti *xanthine oksidase* dan *NADPH oksidase* juga

meningkatkan enzim antioksidan endogen seperti *Superoksida dismutase* (SOD), Katalase, dan *Glutathione peroksidase*.

Polyphenol juga diketahui memiliki fungsi sebagai antiinflamasi. Senyawa ini dapat memodulasi sistem imun dengan mengganggu regulasi sel-sel imun, sintesis sitokin proinflamasi, dan ekspresi gen. Hal ini dilakukan dengan menonaktifkan faktor nuklir *kappa-light-chain-enhancer* dari sel B yang diaktifkan (NF- κ B) dan memodulasi jalur sinyal seperti *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan jalur asam arakidonat. *Polyphenol* juga menghambat enzim yang terlibat dalam produksi eikosanoid, seperti fosfolipase A2 (PLA2), siklooksigenase (COX), dan lipooksigenase (LOX), yang mengarah pada pengurangan produksi mediator proinflamasi seperti prostaglandin dan leukotrien.⁶¹

Polyphenol juga memiliki kemampuan untuk melindungi DNA dari kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif. Senyawa *Polyphenol* mengandung gugus hidroksil yang mendonasikan proton mereka kepada ROS, sehingga membantu menetralkan spesies berbahaya ini dan mencegah kerusakan selanjutnya. Dengan demikian, *Polyphenol* berperan melindungi

DNA dari kerusakan yang dapat berujung pada kematian sel melalui proses nekrotik dan apoptotik.⁶¹

6. *Flavonoid*

Flavonoid merupakan kelompok terbesar dari senyawa fenolik yang terjadi secara alami, yang terdapat di berbagai bagian tanaman baik dalam keadaan bebas maupun sebagai glikosida.⁶²

Centella asiatica mengandung tingkat flavonoid yang tinggi. Flavonoid ini berperan penting sebagai antioksidan yang dapat membantu melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan ini juga berkontribusi pada aktivitas fotoprotektif *Centella asiatica*, yang melindungi kulit dari efek berbahaya paparan sinar UV yang menyebabkan fotoaging.⁵⁰

Flavonoid berperan penting dalam aktivitas antioksidan diukur melalui nilai IC50 dari ekstrak *Centella asiatica*. Selain bersifat antioksidan, dalam penelitian yang dilakukan oleh Kandasamy et al., *Flavonoid* juga diketahui berperan sebagai antiinflamasi. Farmakope India menyatakan bahwa *Centella asiatica* memiliki berbagai manfaat pengobatan dan terapeutik pada kondisi seperti kusta, lupus, tukak varises, eksim,

psoriasis, diare, demam, dan amenore, yang memperkuat perannya sebagai antiinflamasi selain sebagai antioksidan.⁶³ *Flavonoid* mengurangi pembentukan ROS seluler, yang melindungi dari oksidasi DNA.⁶¹ Sehingga *Flavonoid* juga berperan untuk mencegah kerusakan DNA.

7. *Carotene*

Daun pegagan (*Centella asiatica*) mengandung β -karoten sebesar 6580 mg dalam 100 gram. *Carotene* dalam daun Pegagan bersifat sebagai antioksidan yang berperan dalam menangkal radikal bebas.⁶⁴

8. *Tannin*

Kandungan *Tannin* dalam *Centella asiatica* telah terdeteksi dalam beberapa studi fitokimia. Misalnya, dalam penelitian yang dilakukan oleh Kandasamy et al., skrining fitokimia pada ekstrak pucuk, kalus, dan suspensi sel dari *Centella asiatica* menunjukkan keberadaan *tannin*. *Tannin* adalah salah satu dari beberapa senyawa yang ditemukan dalam semua tiga jenis kultur yang diuji dalam penelitian tersebut, yang menunjukkan bahwa *Tannin* merupakan bagian dari komposisi kimia *Centella asiatica*. *Tannin* dikenal memiliki sifat antioksidan. Sifat antioksidan ini berasal

dari kemampuan *Tannin* untuk menangkap radikal bebas dan menghambat proses oksidasi. *Tannin* dapat berinteraksi dengan radikal bebas dan menstabilkannya, sehingga mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif. *Tannin* yang terkandung di dalam *Centella asiatica* berkontribusi pada aktivitas antioksidan tanaman tersebut.⁶³

9. Vitamin C

Pegagan mengandung vitamin C dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan Polifenol, Flavonoid, Karoten dan Tanin. Kandungan vitamin C dari daun *Centella asiatica* berkisar antara 1,3 hingga 7,7 mg/100 gram.⁶⁵ Vitamin C secara langsung berinteraksi dengan spektrum ROS yang luas dan menghentikan reaksi berantai yang dimulai oleh radikal bebas melalui transfer elektron.⁵¹

2.5. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Inhibisi MMP-1 dan Peningkatan Kolagen

Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki hubungan yang signifikan dengan MMP-1 (*Matrix Metalloproteinase-1*) dan Kolagen dalam konteks penyembuhan luka dan perawatan kulit. Senyawa aktif dalam Pegagan, seperti Asiatikosida dan Madecassoside, berperan dalam sintesis Kolagen dan penghambatan MMP-1. MMP-1 adalah enzim yang terlibat dalam

degradasi Kolagen tipe I, yang merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler kulit. Dalam proses penuaan atau kerusakan kulit, aktivitas MMP-1 meningkat, yang mengakibatkan penurunan jumlah dan kualitas Kolagen, sehingga menyebabkan keriput dan kehilangan elastisitas kulit.

Pegagan telah terbukti meningkatkan sintesis Kolagen dalam studi invitro dan invivo. Ekstrak daun Pegagan dapat meningkatkan ekspresi gen yang terlibat dalam produksi Kolagen tipe I dan III, yang penting untuk memperkuat matriks ekstraseluler dan mempercepat proses penyembuhan luka. Selain itu, Pegagan juga dapat menghambat aktivitas MMP-1, sehingga mengurangi degradasi Kolagen dan membantu menjaga integritas struktural kulit.

Dalam konteks paparan UVB, ekstrak daun Pegagan dapat membantu mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh sinar UV dengan cara menghambat aktivitas MMP-1, sehingga mengurangi degradasi Kolagen. Selain itu, Pegagan juga dapat meningkatkan produksi Kolagen tipe I, yang penting untuk memperbaiki dan memelihara integritas struktural kulit yang rusak akibat paparan UVB.

Dalam konteks perlindungan terhadap kerusakan DNA akibat UVB, Pegagan dapat berkontribusi dalam mengurangi stres oksidatif dan memperbaiki kerusakan DNA, yang pada akhirnya dapat mengurangi aktivitas MMP-1 dan mendukung sintesis Kolagen.

Dengan demikian, Pegagan berkontribusi pada peningkatan produksi Kolagen dan pengurangan degradasi Kolagen melalui penghambatan MMP-

1, yang secara keseluruhan mendukung regenerasi kulit, serta memiliki potensi sebagai agen anti-penuaan. Penggunaan ekstrak daun Pegagan sebagai perlindungan terhadap kerusakan kulit oleh UVB dapat menjadi strategi efektif untuk mencegah penuaan dini dan memelihara kesehatan kulit. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme tepat dari efek protektif Pegagan terhadap MMP-1 dan Kolagen setelah paparan UVB. ^{4,8,17,66}

2.6. Krim Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

Krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Biasanya, krim merupakan emulsi air dalam minyak (A/M) atau minyak dalam air (M/A) dan lebih ditujukan untuk penggunaan kosmetika dan estetika. ⁶⁷

Krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki manfaat dalam mengatasi fotoaging karena kandungan senyawa fitokimia seperti terpenoid, yang dapat meningkatkan sintesis Kolagen, memperbaiki fibronectin intraseluler, dan merangsang proliferasi fibroblast dalam pembentukan kulit baru. Selain itu, ekstrak daun Pegagan juga dapat menghambat fase inflamasi hipertrofik pada bekas luka atau scars, yang sering dikaitkan dengan kerusakan akibat paparan sinar matahari. Dalam penelitian klinis, pengaplikasian topikal Madekasosid yang merupakan komponen dari ekstrak daun Pegagan, dikombinasikan dengan vitamin C, menunjukkan peningkatan yang signifikan pada kekencangan, elastisitas,

dan hidrasi kulit, yang semuanya penting dalam perbaikan kulit yang terkena fotoaging.

Krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) juga dikenal memiliki sifat antioksidan karena mengandung senyawa senyawa fitokimia seperti *terpenoid, polyphenols, flavonoid, carotene, tannin*, dan Vitamin C yang memiliki sifat antioksidan, berfungsi sebagai antioksidan alami. Antioksidan ini dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga dapat menghambat kerusakan sel.⁴²

Beberapa kekurangan dari krim ekstrak daun Pegagan, yaitu :

- a. Keterbatasan Penelitian, masih diperlukan lebih banyak penelitian untuk memverifikasi dan memahami sepenuhnya efek ekstrak daun Pegagan pada kulit, terutama dalam bentuk krim.
- b. Potensi iritasi, meskipun tidak umum, beberapa orang mungkin mengalami iritasi atau reaksi alergi terhadap komponen dalam ekstrak daun Pegagan.
- c. Stabilitas produk, krim yang mengandung ekstrak alami seperti Pegagan mungkin memiliki masalah dengan stabilitas dan umur simpan jika tidak diformulasikan dengan benar.
- d. Konsistensi dan penyerapan, krim dengan ekstrak alami mungkin memiliki konsistensi yang tidak konsisten dan mungkin tidak menyerap ke dalam kulit seefektif produk sintetis.
- e. Ketersediaan dan biaya, ketersediaan ekstrak daun Pegagan yang berkualitas dan biaya produksi yang lebih tinggi.

Komposisi krim biasanya meliputi fase minyak dan fase air, yang diemulsikan bersama dengan bantuan emulsifier. Fase minyak dapat terdiri dari berbagai jenis minyak, lilin, dan lipid, seperti minyak kelapa (VCO), lemak kakao, dan beeswax. Fase air biasanya mengandung air (akuades) dan bisa juga mengandung bahan seperti *Xanthan GMencitum* yang berfungsi sebagai pengental atau stabilizer. Emulsifier seperti Tween 80 dan Span 80 digunakan untuk membantu mencampurkan fase minyak dan air agar terbentuk emulsi yang stabil. Selain itu, krim juga bisa mengandung bahan tambahan lain seperti gliserin yang berfungsi sebagai humektan untuk menarik kelembapan ke dalam kulit.⁶⁷

Kelebihan sediaan krim antara lain adalah lebih mudah diaplikasikan, lebih nyaman digunakan pada kulit, tidak lengket, dan mudah dicuci dengan air. Krim juga memiliki kemampuan untuk terabsorpsi dengan baik pada kulit, sehingga banyak industri farmasi memilih memproduksi krim sebagai bentuk sediaan topikal. Karena bentuknya yang praktis dan mudah dalam penggunaannya, krim banyak digemari oleh masyarakat, khususnya kaum wanita dalam penggunaan kosmetik.

Kekurangan sediaan krim antara lain lebih berminyak jika dibandingkan sediaan gel ataupun serum. Krim bisa terasa berat dan berminyak, terutama pada orang dengan kulit berminyak atau kombinasi, yang mungkin tidak menyukai tekstur yang kental dan berat. Penyerapan krim mungkin membutuhkan waktu lebih lama untuk diserap oleh kulit, dan bisa meninggalkan rasa lengket atau berminyak pada permukaan kulit.

Beberapa krim mungkin mengandung bahan yang dapat menyumbat pori-pori dan menyebabkan jerawat, terutama pada individu yang rentan terhadap jerawat.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam proses pembuatan sediaan krim dapat mencakup beberapa aspek teknis dan kualitatif yang mempengaruhi konsistensi, stabilitas, dan efikasi produk akhir. Adapun beberapa hal yang perlu diperhatikan adalah:

- a. Pembuatan krim melibatkan pencampuran fase air dan minyak untuk membentuk emulsi. Tanpa penggunaan emulsifier yang tepat atau teknik pencampuran yang sesuai, emulsi dapat menjadi tidak stabil, menyebabkan pemisahan fase atau penggumpalan.
- b. Proses pembuatan krim yang tidak steril dapat menyebabkan kontaminasi mikroba, yang mengurangi umur simpan produk dan dapat menimbulkan risiko infeksi bagi pengguna.
- c. Suhu yang tidak sesuai selama proses pembuatan dapat mempengaruhi stabilitas dan tekstur krim. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak bahan aktif, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menghambat pencampuran yang efektif.
- d. Krim harus memiliki konsistensi yang sesuai untuk aplikasi yang mudah dan penyerapan yang efektif. Kesalahan dalam formulasi atau proses pembuatan dapat menghasilkan produk yang terlalu kental atau terlalu cair.

- e. Untuk mencegah pertumbuhan mikroba, pengawet sering ditambahkan ke dalam krim. Namun, pengawet tertentu dapat menyebabkan iritasi atau reaksi alergi pada beberapa pengguna.
- f. Beberapa bahan aktif mungkin tidak kompatibel dengan bahan lain dalam formulasi krim, atau mungkin memerlukan kondisi khusus untuk stabilitasnya.

Formulasi krim: Pembuatan krim dibuat berdasarkan formula standar yang menggunakan jenis dasar krim minyak dalam air.^{8,67}

Tabel 2.1. Konsentrasi ekstrak daun Pegagan yang digunakan dalam pembuatan sediaan krim anti penuaan⁸

<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>				
	P0	K3	P2	K4	P4
<i>C. Asiatica Extract</i>	-	2,5%	5%	7,5%	10%
<i>Strearat Acid</i>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<i>Triethanolamine</i>	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<i>Natrium Benzoat</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Gliserin</i>	5	5	5	5	5
<i>Aquadest</i>	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad
	50	50	50	50	50

2.7. Mencit sebagai Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian disebut hewan coba atau hewan model yaitu hewan yang sengaja dipelihara untuk kepentingan penelitian di laboratorium. Sebanyak 40% studi menggunakan Mencit sebagai model laboratorium. Mencit seringkali digunakan dalam penelitian di laboratorium yang berkaitan dengan bidang fisiologi, farmakologi, toksikologi, patologi, hingga psikiatri. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena memiliki kelebihan seperti siklus hidup relatif pendek, banyaknya jumlah anak per kelahiran, mudah ditangani, struktur

anatomi, fisiologi (sistem reproduksi, pernapasan, peredaran darah), biokimia serta genetik mirip dengan manusia.

Penggunaan hewan Mencit beragam umurnya, tergantung dari masing-masing penelitian, mulai dari Mencit umur 30 hari hingga umur 120 hari. Banyak peneliti menggunakan Mencit dengan bobot badan 20 g sampai dengan 40 g. Delapan dari 13 peneliti diketahui menggunakan strain Mencit Balb-C sebagai objek penelitiannya dan yang lainnya menggunakan *Winstar*, *DDW*, *Swiss Webster* dan *C3H*. Suhu normal suatu lingkungan untuk Mencit berkisar 18-26°C. Apabila suhu lebih tinggi dari rentang normalnya maka dapat menyebabkan Mencit mengalami stres dan berpeluang lebih besar untuk terjadinya dehidrasi.⁶⁸

Klasifikasi Mencit menurut adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Chordata*

Class : *Mamalia*

Ordo : *Rodentia*

Famili : *Muridae*

Genus : *Mus*

Spesies : *Mus musculus*



Gambar 2.9. Mencit sebagai hewan coba⁶⁹

Mencit jantan lebih banyak digunakan dalam penelitian karena aktif dalam beraktifitas. selain itu, Mencit jantan juga tidak dipengaruhi oleh hormonal sebagaimana Mencit betina. Pemilihan jenis kelamin jantan lebih didasarkan pada pertimbangan bahwa Mencit jantan tidak mempunyai hormon Estrogen, walaupun ada hanya dalam jumlah yang relatif sedikit serta kondisi hormonal pada jantan lebih stabil jika dibandingkan dengan Mencit betina, karena pada Mencit betina mengalami perubahan kondisi hormonal pada masa-masa tertentu seperti pada masa siklus estrus, masa kehamilan dan menyusui yang dapat mempengaruhi kondisi psikologis hewan uji tersebut. Selain itu tingkat stres pada Mencit betina lebih tinggi dibandingkan dengan Mencit jantan yang mungkin dapat mengganggu pada saat pengujian. Kandang Mencit di laboratorium dapat berupa kotak dengan ukuran panjang 40 cm x lebar 30 cm x tinggi 18 cm untuk kepadatan 5-7 ekor Mencit. Bahan kandang berupa plastik, aluminium atau baja tahan karat, serta dapat juga dari bahan kaca seperti akuarium. Prinsip umumnya adalah kandang harus mudah dibersihkan, disterilkan, tahan lama, tidak mudah dikerat oleh Mencit. Bahan dari Polivinil klorida (PVC) tidak disarankan karena mudah dikerat oleh Mencit dan susah disterilkan karena tidak tahan panas.

Dasar kandang sebaiknya diberi materi yang dapat menyerap air, dan tidak mengandung senyawa berbahaya atau yang mengganggu penelitian. Alas kandang harus diganti secara rutin dan sesegera mungkin jika sudah basah. Jika dibiarkan akan menimbulkan bibit penyakit. Bahan yang cocok

digunakan sebagai alas kandang seperti sobekan kertas, serutan kayu, sisa gergajian kayu, sekam padi, atau zeolit aktif. Masing-masing bahan tersebut mempunyai keuntungan dan kerugian bila digunakan sebagai alas kandang pemeliharaan Mencit.

Salah satu aspek yang menjadi pengaruh terhadap keberlangsungan kehidupan hewan adalah pakan, memeriksa kandungan nutrisi pada pakan merupakan hal yang harus dilakukan demi mencapai standar kesejahteraan bagi hewan coba. Berbagai jenis pakan yang saat ini banyak digunakan ialah pakan berbentuk pelet dengan merek yang komersial. Menurut Hasanah, pakan Mencit diketahui memiliki kandungan protein 10%, lemak 3%, serat 8% dan kadar air 12%. Pakan berbentuk pelet lebih sering digunakan daripada tepung untuk mengurangi perubahan komposisi dan diperlukan untuk membuat aus gigi pada hewan Mencit. Pakan sebaiknya disimpan pada suhu 15-16°C dan dihabiskan paling lama 4-6 minggu setelah kemasan dibuka.⁶⁹

2.7.1. Kriteria Mencit yang Digunakan dalam Percobaan

- a. Mencit yang dapat dijadikan subjek penelitian adalah Mencit yang sehat, bebas dari penyakit dan infeksi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Mencit dikatakan sehat apabila memiliki ciri-ciri fisik seperti, warna bulu putih bersih dan tidak berdiri, mata jernih bersinar, serta berat badan bertambah atau tidak berkurang setiap hari.
- b. Berusia 1-3 bulan dan memiliki berat badan antara 20-30 gram.

- c. Strain Mencit harus dipilih berdasarkan karakteristik genetik yang relevan dengan penelitian. Beberapa peneliti menggunakan strain Balb-C, sementara yang lain mungkin menggunakan Winstar, DDW, Swiss Webster, atau C3H tergantung pada kebutuhan penelitian.
- d. Mencit harus memiliki perilaku yang sesuai untuk penelitian, termasuk sifat-sifat seperti tidak terlalu penakut, dapat berkelompok, dan tidak terlalu agresif untuk memudahkan penanganan.
- e. Mencit yang digunakan untuk penelitian reproduksi harus memiliki siklus reproduksi yang normal dan dapat dikawinkan setelah mencapai usia dewasa, yaitu sekitar delapan minggu.
- g. Aspek kesejahteraan hewan harus diperhatikan, termasuk kondisi pemeliharaan, penanganan yang tepat, serta pre dan post treatment yang sesuai untuk memastikan kesejahteraan Mencit selama penelitian.

Memilih Mencit yang memenuhi kriteria ini sangat penting untuk memastikan integritas penelitian dan kesejahteraan hewan coba.

Peneliti yang menggunakan hewan coba harus memperhatikan kesejahteraan hewan tersebut sesuai dengan prinsip lima kebebasan yaitu bebas dari rasa lapar dan haus, bebas dari rasa tidak nyaman, bebas dari rasa nyeri, trauma, dan penyakit juga bebas

mengekspresikan tingkah laku alami. Penggunaan hewan coba juga harus menerapkan prinsip *replacement* (penggantian), *reduction* (pengurangan), dan *refinement* (perbaikan) (3R). Konsep 3R merupakan etika standar yang dapat digunakan sebagai landasan untuk mewujudkan suatu eksperimen yang sesuai dengan prinsip kesrawan, dengan cara mencari alternatif yang memungkinkan untuk melakukan pengurangan jumlah hewan yang digunakan dalam percobaan, dan menyempurnakan prosedur untuk meminimalkan atau menghilangkan penderitaan hewan coba.

Seluruh perlakuan peneliti pada hewan, mulai dari awal hewan diterima sampai penelitian berakhir, sangat mempengaruhi kesejahteraan hewan dan berdampak pada validitas penelitian yang dilakukan, oleh karena itu penting untuk peneliti menerapkan kaidah lima kebebasan dan prinsip 3R.^{68,69}

Mencit memiliki rentang hidup yang jauh lebih pendek dibandingkan manusia. Penelitian pada mencit dalam durasi waktu yang dipersingkat dapat memberikan informasi awal atau indikasi tentang efek jangka pendek dari suatu intervensi penelitian.^{68,49}

2.7.2. Faktor Perancu pada Mencit sebagai Hewan Coba

Dalam penelitian biomedis yang menggunakan Mencit sebagai hewan coba, terdapat berbagai faktor perancu yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Faktor-faktor tersebut meliputi:

- a. Usia Mencit, usia Mencit yang digunakan dalam penelitian dapat bervariasi tergantung dari tujuan penelitian, bisa mulai dari usia 30 hari hingga 120 hari.
- b. Jenis kelamin Mencit, jenis kelamin merupakan faktor penting yang perlu dipertimbangkan karena dapat mempengaruhi respons fisiologis dan biokimia terhadap intervensi yang sedang diteliti. Mencit jantan lebih banyak digunakan daripada Mencit betina karena tidak terpengaruh siklus hormonal yang bisa mempengaruhi hasil penelitian.
- c. Berat badan, berat badan mencit merupakan faktor penting dalam penelitian karena dapat mempengaruhi hasil eksperimen. Standar kebutuhan pakan mencit memperhatikan ukuran atau bobot tubuhnya, yang berkaitan dengan pertumbuhan berat badan mereka. Mencit dewasa dapat memakan 3-5 gram pakan per hari, dan pertumbuhan berat badan mencit normal adalah 1 gram per ekor per hari jika konsumsi pakan adalah 10 gram per ekor per hari. Berat mencit jantan umur 4 minggu mencapai 18-20 gram, jantan dewasa sekitar 20-40 gram, sedangkan betina 18-35 gram. Oleh karena itu, pemberian pakan yang berlebihan dan tidak sesuai dengan standar dapat menyebabkan berbagai macam penyakit, yang dapat menjadi variabel pengganggu dalam penelitian.

- d. Status nutrisi Mencit, status nutrisi Mencit berperan penting dalam hasil penelitian. Pakan yang diberikan harus memenuhi standar nutrisi yang tepat untuk mendukung kesehatan dan pertumbuhan yang optimal. Pakan yang sering digunakan adalah pakan berbentuk pelet dengan kandungan nutrisi yang telah ditentukan.
- e. Kondisi lingkungan (suhu, kelembaban) pada kandang Mencit, kondisi lingkungan tempat Mencit dipelihara, termasuk suhu dan kelembaban, juga harus dikelola dengan baik. Suhu dan kelembaban yang tidak tepat dapat menyebabkan stres pada hewan coba dan mempengaruhi hasil penelitian. Peneliti harus memastikan bahwa kondisi kandang, termasuk sirkulasi udara, suhu, kelembaban, dan pencahayaan, sesuai dengan kebutuhan spesifik dari hewan coba yang digunakan.

Dengan memperhatikan faktor-faktor perancu ini, peneliti dapat meminimalkan variabilitas dalam penelitian dan meningkatkan validitas dan reliabilitas hasil yang diperoleh dari penggunaan Mencit sebagai model hewan coba.⁶⁹

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB memiliki dampak signifikan terhadap kulit, yang meliputi peningkatan kadar spesies oksigen reaktif (ROS), tingkat DNA damage dan status inflamasi. Peningkatan kadar ROS juga meningkatkan kondisi stres oksidatif yang berujung pada kondisi fotoaging, di mana terjadi peningkatan aktifitas *Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1), dan penurunan tingkat Kolagen.

Ketika kulit terpapar sinar UVB, terjadi peningkatan produksi ROS, yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada komponen seluler termasuk lipid, protein, dan DNA, mengubah strukturnya dan mengganggu fungsinya. Foton UVB berinteraksi dengan oksigen atom untuk mendorong pembentukan turunan radikal bebas seperti Superoksida (O_2^-), Hidrogen peroksida (H_2O_2), Oksigen singlet (1O_2), dan Radikal hidroksil (OH^-) yang sangat reaktif. ROS ini juga berperan dalam mengaktifkan jalur sinyal transduksi yang mengarah pada peningkatan ekspresi MMP-1, enzim yang bertanggung jawab untuk degradasi Kolagen.

Kerusakan DNA yang disebabkan oleh paparan UVB dan peningkatan kadar ROS merupakan kerusakan langsung pada DNA mitokondria (mtDNA) dan DNA inti, yang dapat mengakibatkan mutasi dan gangguan dalam regulasi genetik serta ekspresi gen. Kerusakan ini dapat

mempengaruhi fungsi seluler, termasuk pada sel fibroblas yang bertanggung jawab atas produksi Kolagen, sehingga mengurangi sintesis Kolagen baru.

Status inflamasi juga meningkat sebagai respons terhadap paparan UVB dengan ROS secara langsung mengaktifkan reseptor permukaan sel untuk sitokin inflamatori seperti IL-1 dan TNF- α . UVB dapat mengaktifkan jalur *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) yang selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi AP-1 yang berperan pada transkripsi *Matrix Metalloproteinases* (MMPs). Selain itu, paparan UVB juga menginduksi aktivasi *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) yang merupakan faktor transkripsi dalam respons inflamasi. NF- κ B mengatur transkripsi mediator proinflamasi seperti *interleukin-6* (IL-6) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), yang terlibat dalam mempromosikan inflamasi dan stres oksidatif.⁷⁰

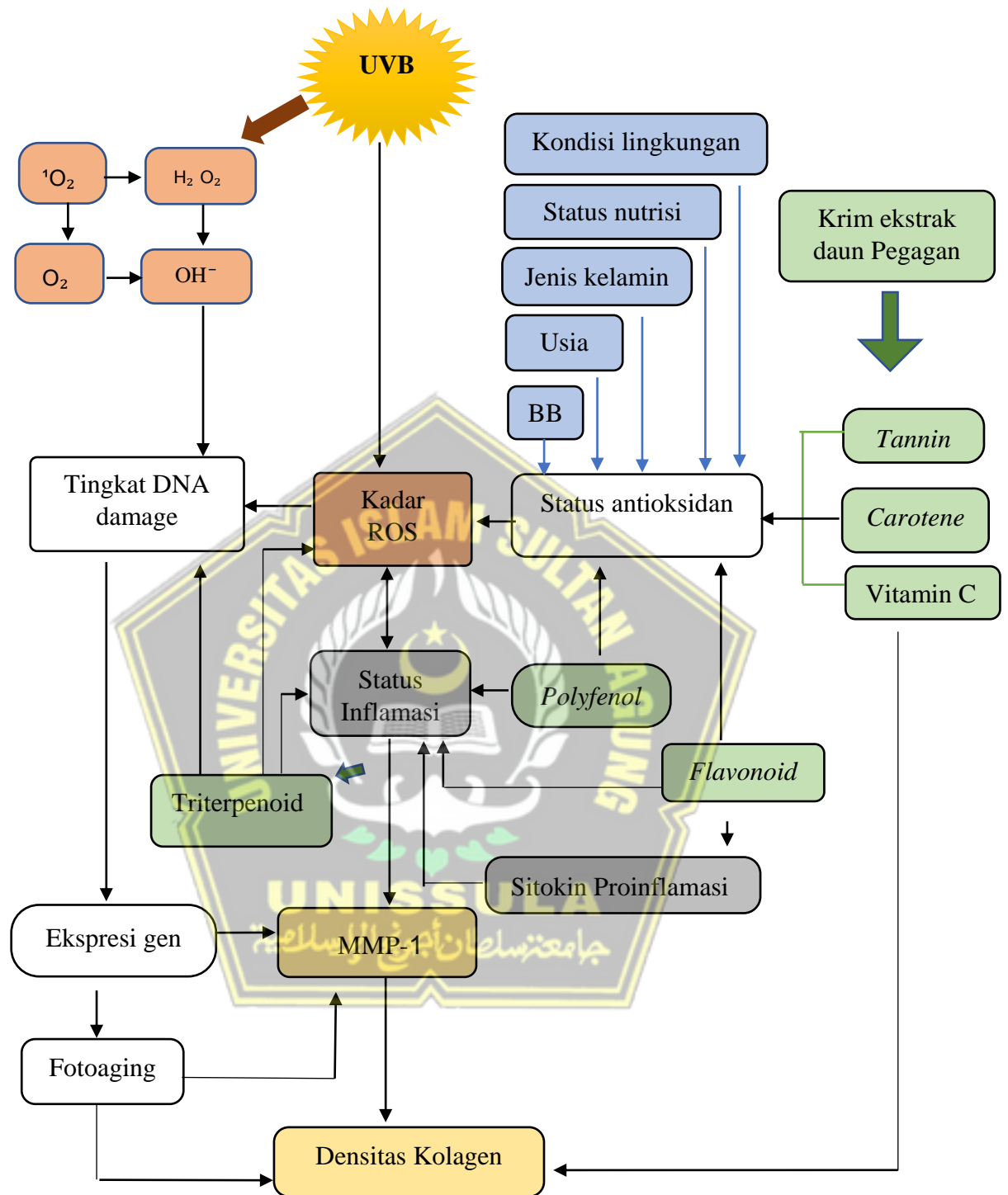
Stres oksidatif yang dihasilkan dari paparan UVB juga berperan pada proses fotoaging, dengan aktivitas MMP-1 yang meningkat menyebabkan degradasi Kolagen dan berkontribusi pada hilangnya elastisitas kulit.

Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki kandungan zat aktif yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi yaitu senyawa *Polyfenol*, *Flavonoid*, *Carotene*, *Tannin*, vitamin C, dan *Triterpenoid* seperti *Asiaticoside*, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, *Madecassic acid* yang berperan dalam mengurangi aktivitas ROS. Senyawa-senyawa ini dapat menangkal radikal bebas yang dihasilkan oleh paparan sinar UVB, mengurangi oksigen singlet serta dekomposisi peroksida, sehingga melindungi sel-sel kulit dari

kerusakan oksidatif. *Polyfenol* dan *Flavonoid* memiliki peran penting sebagai antiinflamasi, baik secara langsung maupun melalui peningkatan status antioksidan. Mekanisme kerja dengan mengurangi pelepasan sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6. Selain itu, *Polyfenol* dan *Flavonoid* yang ditemukan dalam ekstrak *Centella asiatica*, memiliki kemampuan untuk menghambat ekspresi NF- κ B yang berperan dalam ekspresi gen terkait dengan proses inflamasi. Dengan menghambat aktivasi NF- κ B, *Polyfenol* dan *Flavonoid* dapat mengurangi ekspresi gen-gen yang terlibat dalam produksi sitokin proinflamasi. *Polyfenol* dan *Flavonoid* dapat mengurangi inflamasi baik secara langsung melalui penghambatan jalur inflamasi maupun secara tidak langsung melalui peningkatan status antioksidan dan pengurangan stres oksidatif dengan menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS).^{48,71}

Senyawa-senyawa dalam Pegagan dapat menghambat fase inflamasi yang berkaitan dengan kerusakan akibat paparan sinar UVB, serta merangsang proliferasi fibroblast yang penting dalam pembentukan kulit baru. Penggunaan ekstrak daun Pegagan dalam sediaan krim topikal diharapkan bisa menghambat aktifitas MMP-1 dan meningkatkan sintesis Kolagen pada kulit yang mengalami fotoaging akibat paparan UVB.

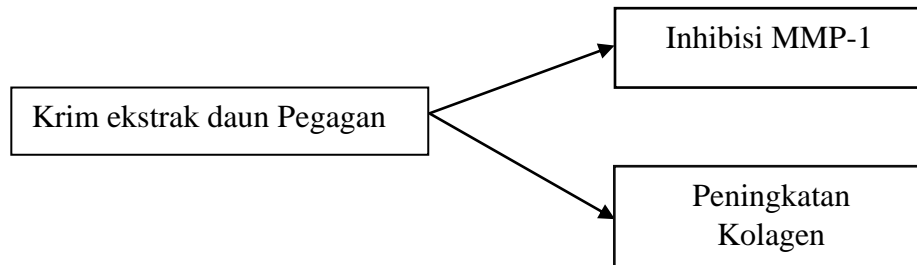
Faktor perancu yang bisa mempengaruhi hasil penelitian ini diantaranya adalah: usia, jenis kelamin, berat badan, status nutrisi, kondisi lingkungan tempat tinggal hewan coba seperti suhu dan kelembabannya.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep

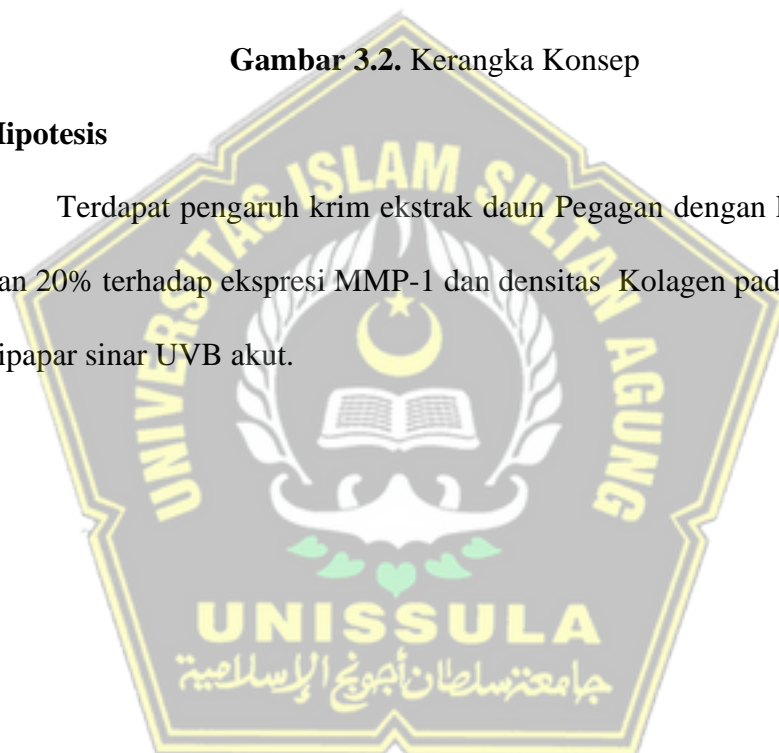
Konsep penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh krim ekstrak daun Pegagan dengan konsentrasi 10% dan 20% terhadap ekspresi MMP-1 dan densitas Kolagen pada Mencit yang dipapar sinar UVB akut.

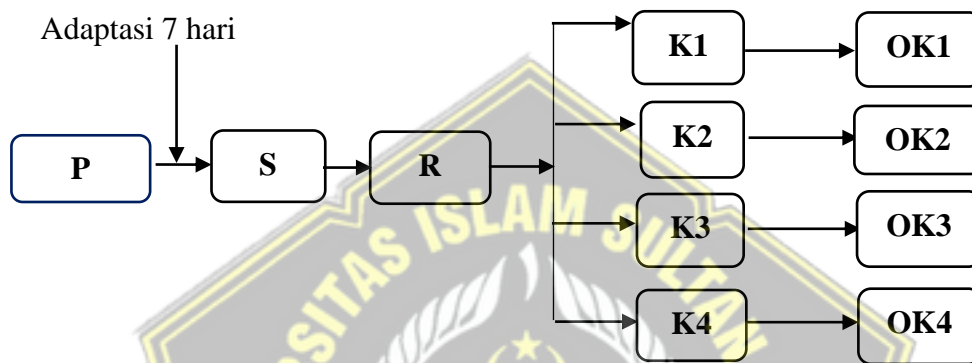


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* terhadap hewan coba Mencit balb C.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

P : Populasi Penelitian

S : Sampel penelitian

R : Randomisasi menjadi 4 kelompok

K1 : Kelompok kontrol normal yang diberi pakan *standard* tanpa diberi paparan sinar UVB akut.

K2 : Kelompok yang diberi pakan *standard* dan diberi paparan sinar UV-B akut dan basis krim (*placebo*) sebagai kontrol negatif.

K3 : Kelompok perlakuan yang diberi dosis krim ekstrak daun Pegagan 10% dan diberi paparan sinar UVB akut.

K4 : Kelompok perlakuan yang diberi dosis krim ekstrak daun Pegagan 20% dan diberi paparan sinar UVB akut.

OK1 : Observasi pada kelompok 1

OK2 : Observasi pada kelompok 2

OK3 : Observasi pada kelompok 3

OK4 : Observasi pada kelompok 4

4.2. Populasi Penelitian

Populasi hewan uji pada penelitian adalah Mencit jenis Balb-C. Mencit didatangkan dari peternak Mencit, kisaran umur 8-10 minggu, dengan berat 26-30 gram/ekor, jenis kelamin jantan, kondisi sehat dan aktif, diadaptasi di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Mencit ditempatkan di kandang berukuran 20x30 cm, Tiap Mencit ditempatkan dalam satu kandang, tidak digabung. Mencit diberi jenis pakan standard BR 594 sebanyak 30 gram/hari dan air minum berupa aquades, suhu ruangan pemeliharaan berkisar 25,8 °C. dengan ventilasi dan luas ruangan yang cukup. Mencit diadaptasikan selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.

4.2.1. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi:

1. Mencit jantan jenis Balb-C yang sehat berumur 8-10 minggu, aktif selama masa adaptasi.
2. Berat badan sebelum perlakuan 26-30 gram.
3. Penempatan kandang, ditempatkan pada tempat yang sama (di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang).

b. Kriteria Eksklusi:

1. Berat badan mencit menurun daripada berat badan sebelumnya.

2. Gerakan mencit tidak aktif, kemungkinan stres atau sakit saat masa adaptasi.
3. Mencit mati selama masa adaptasi.

4.2.2. Kriteria *Drop Out*

1. Mencit mati saat penelitian berlangsung
2. Mencit menjadi sakit selama perlakuan

4.2.3. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Teknik pengambilan sampel penelitian ini menggunakan cara *simple random sampling*⁷². Mencit sebanyak 24 ekor yang memenuhi kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak sederhana, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sebelum dilakukan perlakuan, dilakukan pencukuran bulu punggung mencit dengan ukuran 2x3 cm pada 24 ekor sampel Mencit. Sampel jaringan kulit diambil pada Mencit yang telah di euthanasia (dimatikan sesuai prosedur yang diijinkan dan sesuai etika penelitian) pada hari keenam. Euthanasia dilakukan dengan Kloroform dengan cara Mencit dimasukkan ke dalam tabung tertutup selama 5-10 menit. Setelah Mencit tidak menunjukkan tanda-tanda kehidupan, dilakukan fiksasi di meja bedah dan diseksi pada kulit punggung Mencit yang akan diteliti dengan ukuran 2x2 cm. Segera setelahnya, dilakukan fiksasi jaringan untuk menjaga integritas dan struktur jaringan dengan larutan buffer Formalin 10%. Selanjutnya jaringan dikirim

ke laboratorium Patologi Anatomi untuk diproses lebih lanjut yaitu pemeriksaan MMP-1 dengan metode IHC dan pemeriksaan histopatologi Kolagen dengan pewarnaan Sirius red.

4.2.4. Jumlah Sampel

Menurut WHO besar sampel per kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% (1 ekor) untuk menghindari *loss of flow*.⁷³ Sampel dirandomisasi menggunakan cara *simple random sampling*, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol negatif, dan 2 kelompok perlakuan. Jumlah keseluruhan sampel Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor dihitung menggunakan rumus Federer,⁷⁴ sebagai berikut:

$$\text{Rumus Federer} = (n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n: besar sampel setiap kelompok

T: jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan:

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

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

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$n-1 \geq 5$$

$$n \geq 5+1$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan rumus di atas ditetapkan jumlah sampel Mencit per kelompok adalah 6 ekor, karena ada 4 kelompok, maka jumlah sampel total adalah 24 ekor.

4.3. Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah krim ekstrak daun Pegagan.

Daun Pegagan kering diperoleh dari perkebunan Herbal Dago, Kabupaten Bandung, Jawa Barat yang diproses secara khusus dengan pengeringan menggunakan oven khusus simplisia dengan suhu 40°C.⁷⁵ Daun Pegagan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Setelah diperoleh ekstrak kental dibuat sediaan krim menggunakan basis krim standard dengan konsentrasi 10% dan 20%. Krim ekstrak daun Pegagan dioleskan di punggung kulit Mencit sebanyak 0,3 gram per hari selama 5 hari.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian adalah :

1. Inhibisi MMP-1

Inhibisi MMP-1 dalam penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan kulit punggung Mencit yang diambil pada hari keenam, kemudian diperiksa ekspresi MMP-1 dengan metode Imunohistokimia menggunakan kit antibodi primer

PAA097Ra01 Polyclonal Antibody to Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1) rabbit polyclonal dari *Cloude-Clone Corp* dan kit antibodi sekunder merk *Starr Trek Universal HRP Detection*. Inhibisi MMP-1 ditandai dengan penurunan ekspresi MMP-1. Ekspresi MMP-1 dinyatakan positif jika sitoplasma sel berwarna coklat, sedangkan ekspresi negatif bila sitoplasma sel berwarna biru. Pemeriksaan MMP-1 dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Peningkatan Kolagen

Peningkatan Kolagen dalam penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan kulit Mencit yang diambil pada hari keenam, kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menilai peningkatan densitas Kolagen dengan pewarnaan Sirius Red. Peningkatan densitas Kolagen ditandai dengan terlihatnya peningkatan kepadatan atau intensitas warna merah pada area yang mengandung Kolagen. Pemeriksaan Kolagen dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang Jawa Tengah.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat

Peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa :

- a. UVB *light* merk Lightbources FS 72T12-UVB-HO, lampu

berbentuk TL.

- b. Pisau cukur
- c. Kandang paparan
- d. Kandang pemeliharaan
- e. Tempat air minum Mencit
- f. Pemotong rambut.

Alat – alat yang digunakan untuk pengumpulan data

- a. Pemeriksaan Imunohistokimia

Untuk pemeriksaan Imunohistokimia, alat-alat yang diperlukan meliputi:

- 1) Mikrotom
- 2) *Microwave*
- 3) *Pressure cooker*
- 4) *Autoclave*
- 5) *Waterbath*
- 6) Mikroskop Cahaya⁷⁶

- b. Pemeriksaan histopatologi

- 1) Alat penyimpan slide
- 2) Oven jaringan
- 3) Penjepit slide
- 4) Mikroskop dan kamera mikroskop
- 5) Komputer dan perangkat lunak analisis gambar yang digunakan untuk mengolah dan menganalisis gambar yang

diambil dari kamera mikroskop.

- 6) Lemari es untuk mendinginkan blok parafin sebelum pemotongan
- 7) *Rotary microtome* dan *disposable Knife* untuk pemotongan blok parafin
- 8) *Water bath* dengan suhu 60°C untuk memekarkan pita parafin
- 9) Entelan dan *deck glass* untuk mounting.⁷⁷

4.4.2. Bahan

4.4.2.1. Pembuatan Krim Ekstrak Daun Pegagan

- a. Basis krim
- b. Ekstrak daun Pegagan kering

4.4.2.2. Pemeriksaan Imunohistokimia

- a. Jaringan kulit sampel dalam larutan formalin
- b. Parafin
- c. Antibodi Primer untuk MMP-1
- d. Antibodi sekunder (enzim/fluorofor)
- e. Reagen deteksi⁷⁶

4.4.2.3. Pemeriksaan Histopatologi

- a. Sampel jaringan kulit Mencit
- b. Formalin 10% untuk fiksasi sampel jaringan
- c. Alkohol dengan konsentrasi yang berbeda (70%, 96%, dan absolut) untuk proses dehidrasi sampel.

- d. Parafin untuk impregnasi dan pembuatan blok parafin.
- e. Xylol untuk proses clearing dan deparafinisasi
- f. Reagen pewarnaan Sirius red untuk pewarnaan preparat.⁷⁷

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical Clearance penelitian diajukan kepada Komite Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Pembuatan Krim Ekstrak Daun Pegagan

Untuk membuat krim yang mengandung ekstrak daun Pegagan, sebagai berikut:

- a. Daun Pegagan kering dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak.
- b. Maserasi serbuk *Centella asiatica* dengan etanol 96% selama 3 hari, kemudian remaserasi selama 5 hari.
- c. Saring hasil maserasi dan uapkan filtrat hingga hampir kering di atas *water bath*, kemudian timbang dan simpan pada suhu -4°C di dalam lemari es untuk penggunaan selanjutnya .

Setelah didapatkan ekstrak daun Pegagan kemudian dilakukan pembuatan krim ekstrak daun Pegagan :

- a. Timbang bahan-bahan yang akan digunakan untuk pembuatan krim, termasuk fase minyak dan fase air.

- b. Panaskan fase minyak dan fase air secara terpisah hingga mencapai suhu yang sama, sekitar 70-75°C, untuk memastikan semua bahan larut dengan baik.
- c. Tuangkan perlahan fase minyak ke dalam fase air sambil diaduk terus menerus untuk membentuk emulsi.⁷⁸
- d. Setelah emulsi terbentuk, tambahkan ekstrak daun Pegagan 10% dan 20% dalam wadah terpisah yang telah disiapkan. Kemudian campuran tersebut terus diaduk hingga tercampur rata.

Tabel 4.1. Formula Basis Krim⁷⁹

No	Bahan	Formula minyak dalam air (%)
1.	Asam Stearat	15
2.	Setil Alkohol	4
3.	Trietanolamin	1
4.	Gliserin	8
5.	Metil Paraben	0,1
6.	Propil Paraben	0,05
7.	Aquades	Ad 100

Basis krim terdiri dari asam stearate, setil alkohol trietanolamin, gliserin, metil paraben, propil paraben dan aquades. Pembuatan basis krim dilakukan dengan meleburkan fase minyak yaitu asam stearate, setil alkohol dan propil paraben di atas penangas air. Dimasukkan fase minyak ke dalam mortir panas lalu ditambahkan fase air dan digerus hingga terbentuk basis krim.

Tabel 4.2. Formula krim yang di buat⁷⁹

Bahan	Konsetrasi (%)		
	F0 (Plasebo)	F1 (10%)	F2 (20%)
Ekstrak Daun Pegagan (gram)	-	2	4
Dasar krim (gram)	20	18	16

4.5.3. Penetapan Dosis

Dosis pemberian krim ekstrak daun Pegagan secara topikal pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 10% dan 20%. Penggunaan topikal krim ekstrak daun Pegagan dilakukan setiap hari sebanyak 0,3 gram/Mencit untuk kedua konsentrasi di atas.²²

4.5.4. Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 4 dan tiap kelompok terdiri dari 6 sampel.

1. Kelompok I : Kelompok kontrol normal yaitu Mencit sehat ,tidak mendapatkan paparan sinar UVB.
2. Kelompok II : Kelompok kontrol negatif, Mencit dipapar sinar UVB dengan pemberian basis krim secara topikal.
3. Kelompok III : Kelompok perlakuan 1, Mencit dipapar sinar UVB dan diberi krim ekstrak daun Pegagan 10% secara topikal.
4. Kelompok IV : kelompok perlakuan 2, Mencit dipapar sinar UVB dan diberi krim ekstrak daun Pegagan 20% secara topikal.

4.5.5. Perlakuan Paparan UVB dan Pengolesan Krim Ekstrak Daun Pegagan

Penyinaran UVB dilakukan selama 5 hari, setiap harinya dilakukan penyinaran selama 6 menit dengan dosis UVB sebesar 1 MED (*Minimal Erythema Dose*)/hari atau $360\text{mJ}/\text{cm}^2$,⁸⁰ total dosis selama 5 hari adalah $1800\text{ mJ}/\text{cm}^2$ dengan jarak penyinaran 30 cm dari kulit punggung Mencit. Setelah paparan UVB, kulit Mencit diolesi krim sebanyak 0,3 mg .

4.5.6. Prosedur Pemeriksaan MMP-1

Inhibisi MMP-1 dinilai ekspresi gennya dengan metode Imunohistokimia dengan langkah - langkah sebagai berikut :

- a. Persiapan jaringan
 1. Potong jaringan setebal 4-5 mikron dan mengapung di atas penangas air. Jangan gunakan perekat di dalam penangas air.
 2. Tempatkan bagian jaringan pada kaca objek bermuatan positif.
 3. Tiriskan kelebihan air dari slide.
 4. Keringkan jaringan 30-60 menit dalam oven 37°C; lalu keringkan selama 30 menit pada suhu 60°C.
- b. Protokol Pewarnaan IHC :
 1. Deparafinisasi bagian jaringan yang dihangatkan dalam 3 kali penggantian Slide Brite masing-masing selama 3 menit.

2. Hidrat kaca objek dalam rangkaian alkohol bertingkat (100%, 95% dan 70%) ke dalam air kran. Bilas slide dalam air deionisasi.
3. Oleskan 4 tetes Peroxidazed 1 (penghambat peroksidase endogen).
4. Inkubasi selama 5 menit. Cuci dengan air keran dan bilas dengan air Deionisasi.
5. Perlakuan awal opsional: panaskan slide yang ditentukan selama 40 menit pada suhu 95°C dalam Diva atau *Borg Decloaker*. Slide didinginkan selama 20 menit. Cuci dengan air keran dan bilas dengan Air deionisasi.
Sebagai alternatif, pressure cooker dapat digunakan pada suhu 125°C selama 30 detik hingga 3 menit.
6. Pra-perawatan Opsional: cerna jaringan yang ditentukan dengan Carezyme I (Trypsin) selama 10-20 menit pada suhu 37°C atau Carezyme II (Pepsin) selama 5 menit pada suhu 37°C. Cuci slide dengan air kran dan bilas dengan air deionisasi.
7. Usap bagian tisu dengan hati-hati untuk menghilangkan kelebihan air. Buat penghalang hidrofobik di atas dan di bawah bagian jaringan dengan Pena Super PAP (panjangnya sekitar 30mm atau 48mm). Jangan biarkan tisu mengering.
8. Banjiri semua slide dengan buffer pencuci PBS 1x.

9. Tiriskan kaca objek dan oleskan 4 tetes Background Sniper (penghambat protein) selama 15 menit pada suhu kamar.
 10. Tiriskan protein blocker dan oleskan 4 tetes Antibodi Primer yang sesuai selama 30-60 menit. Oleskan 4 tetes pengencer antibodi atau serum kontrol negatif pada kontrol negatif.
 11. Cuci dalam 2 kali penggantian buffer pencuci PBS 1X masing-masing selama 2 menit.
- c. Tiriskan slide.
 - d. Teteskan 4 tetes Trekkie Universal Link. Inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar.
 - e. Cuci dalam 2 kali penggantian buffer pencuci PBS 1X masing-masing selama 2 menit.
 - f. Tiriskan slide.
 - g. Oleskan 4 tetes TrekAvidin-HRP. Inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
 - h. Pencucian dalam 2 kali pergantian 1X buffer pencuci PBS masing-masing selama 2 menit. Tiriskan slide.
 - i. Oleskan 4 tetes larutan Betazoid DAB Chromogen. Kembangkan 3-5 menit pada suhu kamar.
 - j. Tambahkan 1 tetes DAB Chromogen ke dalam 1,0 ml buffer media dan aduk rata.
 - k. Cuci dengan air deionisasi.
 - l. Tambahkan 4 tetes CAT *Hematoxylin* selama 30-60 detik. Cuci

dengan air kran.

- m. Inti biru dalam 1x buffer pencuci PBS selama 1 menit. Tiriskan slide.
- n. Cuci dengan air kran dan bilas dengan air deionisasi.
- o. Dehidrasi dalam 3 kali penggantian alkohol 100% dan jernih dalam 3 kali penggantian xilena.
- p. Mounting dan tutup dengan deck glass.⁸¹
- q. Preparat jaringan diperiksa dengan menggunakan Mikroskop merk Olympus seri CX22 dengan kamera Optilab untuk foto jaringan. Perbesaran lensa okuler mikroskop 10x, lensa obyektif 40x dan lensa Optilab 13x.

4.5.7. Prosedur Pemeriksaan Kolagen

Peningkatan Kolagen diukur jumlahnya melalui pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop Olympus CX21 yang dilengkapi dengan Kamera optilab dengan pembesaran 100x. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan software Image J untuk mengetahui densitas Kolagen.⁸²

Metode tehnik pembuatan preparat histopatologi:

- a. Organ yang telah dipotong secara representatif dan telah difiksasi formalin 10% 3 jam.
- b. Bilas dengan air mengalir 3-5 kali.

- c. Dehidrasi dengan alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam.
- d. *Clearing*: xylol I selama 1 jam, xylol II selama 1 jam
- e. Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C.
- f. Pembuatan blok parafin: sebelum dilakukan pemotongan blok parafin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan *rotary microtome* dengan menggunakan *disposable knife*. Pita parafin dimekarkan pada *water bath* dengan suhu 60°C.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Sirius Red

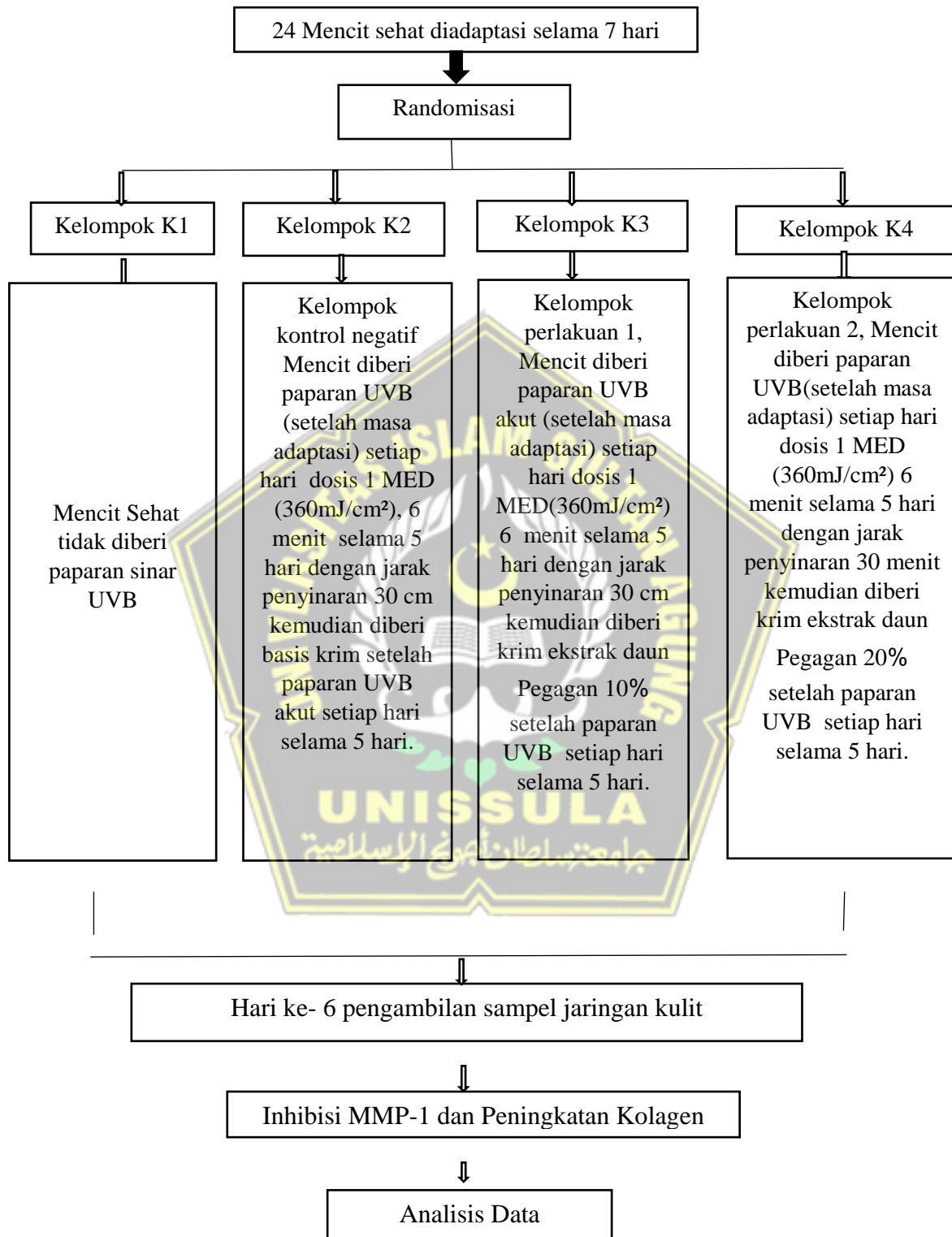
Pemulasan Sirius Red:

- a. Fiksasi jaringan menggunakan formalin.
- b. Penyematan dalam Parafin, jaringan disemprotkan dalam blok Parafin.
- c. Pemotongan, potongan tipis jaringan dipotong menggunakan Mikrotom.
- d. Dewaxing dan rehidrasi, potongan jaringan dideparafinisasi dan direhidrasi.

- e. Pewarnaan dengan Sirius Red, jaringan diwarnai dengan larutan Sirius Red yang biasanya mengandung larutan pewarna Sirius Red dalam larutan asam pikrat.
- g. Pencucian, setelah pewarnaan jaringan dicuci untuk menghilangkan kelebihan pewarna.^{22,30}



4.6. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa tengah. Penelitian dilakukan pada Februari 2024 dengan lama penelitian 30 hari.

4.8. Analisis Data

Data yang sudah didapat, ditabulasi, dan dilakukan analisis deskriptif untuk mendapatkan nilai *mean* dan standar deviasi. Kemudian dilakukan Uji *Shapiro Wilk* untuk menilai normalitas data dan uji *Levene* untuk menilai homogenitas data. Didapatkan data berdistribusi normal dan homogen, kemudian dilakukan uji statistik Parametrik dengan uji *One Way Anova*. Didapatkan nilai $P > 0,05$ pada Uji *One Way Anova*, berarti tidak ada perbedaan bermakna di antara kelompok. Distribusi data tidak normal dan homogen dilakukan uji statistik non Parametrik *Kruskal Wallis*. Didapatkan nilai $P < 0,05$ pada uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan *SPSS for Windows*.

BAB V

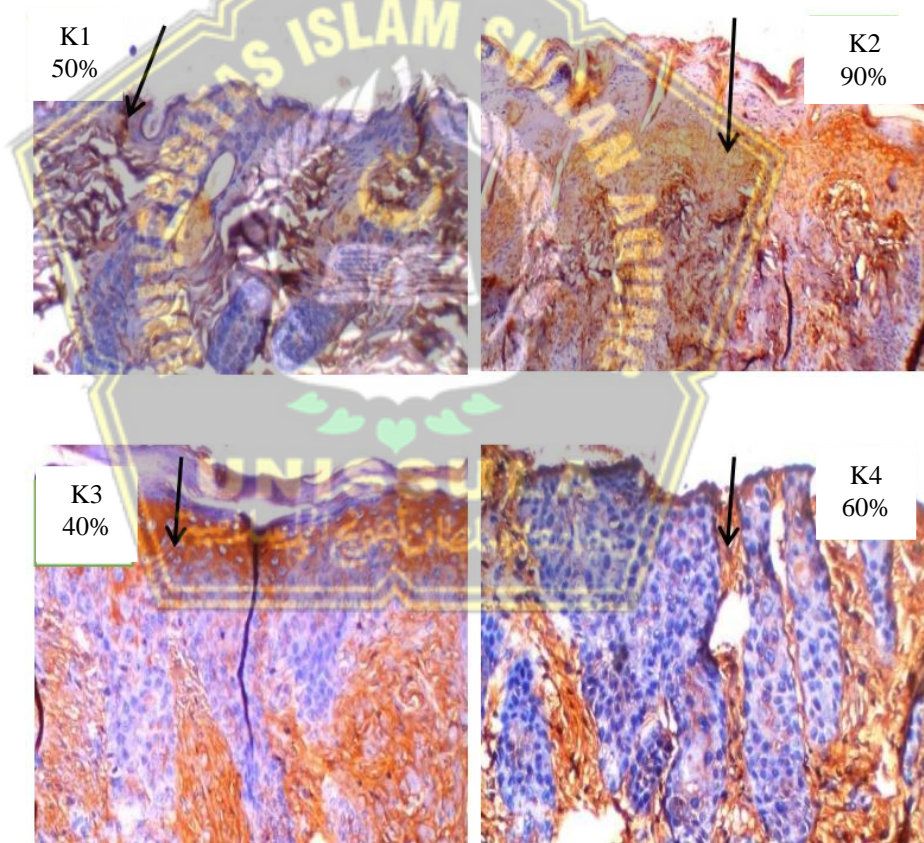
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan pada bulan Februari – Maret 2024 di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Jawa Tengah dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa tengah. Subjek penelitian adalah Mencit jantan jenis Balb C dengan berat 26-30 gram/ekor yang dipapar sinar UVB dengan waktu penyinaran selama 6 menit dengan dosis 1 MED (360mJ/cm²), jarak penyinaran 30 cm, dilakukan setiap hari selama 5 hari. Selama penelitian berlangsung tidak ada hewan coba yang mengalami *dropout*. Subjek penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yaitu K1, Mencit sehat (tidak mendapatkan paparan sinar UVB), Kelompok Kontrol negatif (K2) yaitu Mencit yang dipapar sinar UVB dan diberi basis krim secara topikal, Kelompok K3 yaitu Mencit yang dipapar sinar UVB dan diberi krim ekstrak daun Pegagan 10% secara topikal, Kelompok K4 yaitu Mencit yang dipapar sinar UVB dan diberi krim ekstrak daun Pegagan 20% secara topikal selama 5 hari. Pada hari keenam dilakukan pengambilan sampel jaringan kulit Mencit dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi MMP-1 dan densitas Kolagen di laboratorium Patologi Anatomi.

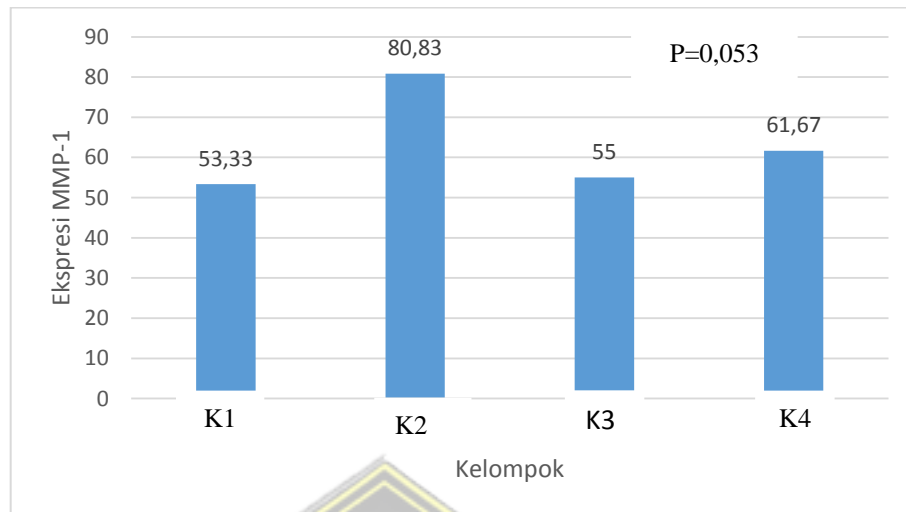
5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Ekspresi MMP-1

Pengukuran ekspresi MMP-1 dilakukan dengan metode Imunohistokimia. Inhibisi MMP-1 ditandai dengan penurunan ekspresi MMP-1. Ekspresi MMP-1 dinyatakan positif jika sitoplasma sel berwarna coklat, sedangkan ekspresi negatif bila sitoplasma sel berwarna biru. MMP-1 berperan dalam degradasi Kolagen.



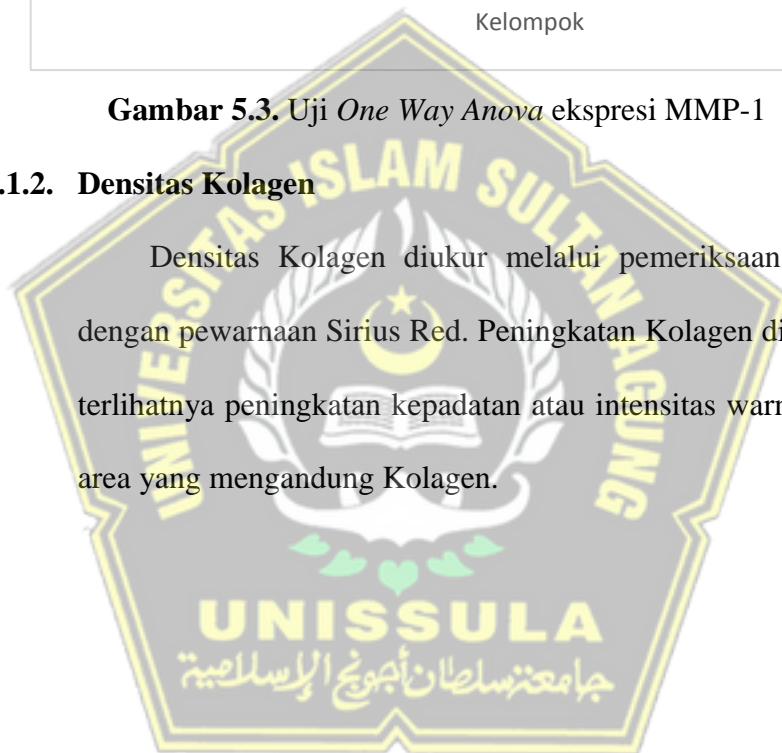
Gambar 5.2. Gambaran Imunohistokimia ekspresi MMP-1 dengan pembesaran 200x. Ekspresi positif ditunjukkan panah warna hitam. K1: didapatkan pulasan IHC MMP-1 pada kurang lebih 50% sitoplasma epidermis. K2: didapatkan pulasan IHC MMP-1 pada kurang lebih 90% sitoplasma epidermis. K3: didapatkan pulasan IHC MMP-1 pada kurang lebih 40% sitoplasma epidermis. K4: Didapatkan pulasan IHC MMP-1 pada kurang lebih 60% sitoplasma epidermis.

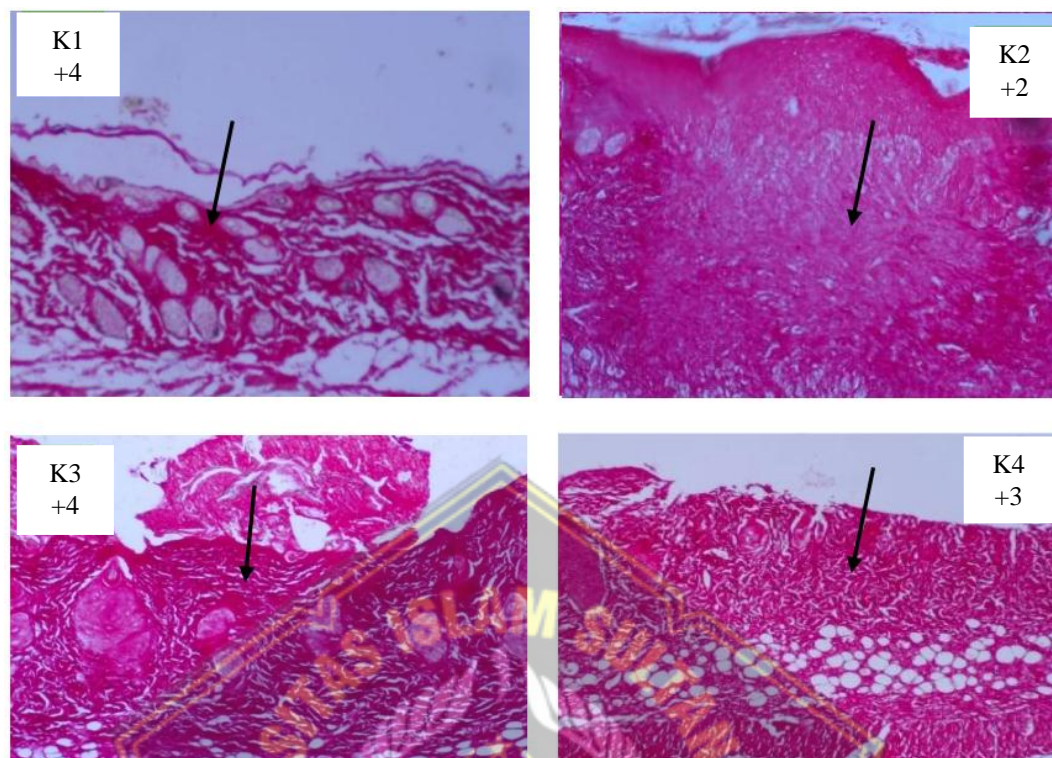


Gambar 5.3. Uji *One Way Anova* ekspresi MMP-1

5.1.2. Densitas Kolagen

Densitas Kolagen diukur melalui pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan Sirius Red. Peningkatan Kolagen ditandai dengan terlihatnya peningkatan kepadatan atau intensitas warna merah pada area yang mengandung Kolagen.





Gambar 5.4. Gambaran mikroskopik densitas Kolagen pewarnaan Sirius Red dengan pembesaran 100x. Panah hitam merupakan area positif serabut Kolagen, ditunjukkan oleh warna serabut yang merah muda. K1+4 menandakan kepadatan serabut Kolagen pada daerah luka sangat rapat. K2 +2 menandakan kepadatan serabut Kolagen pada daerah luka sedang. K3+4 menandakan kepadatan serabut Kolagen pada daerah luka sangat rapat. K4+3 menandakan kepadatan serabut Kolagen pada daerah luka rapat.

Tabel 5.1. Hasil Penelitian Ekspresi MMP-1 dan Densitas Kolagen

Variabel	Kelompok				P
	K1 Mean ± SD n = 6	K2 Mean ± SD n = 6	K3 Mean ± SD n = 6	K4 Mean ± SD n = 6	
Ekspresi MMP-1	53,33±24,221	80,83±13,571	55,00±12,247	61,67±18,348	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,415	0,459	0,101	0,149	
<i>Levene's Test</i>					0,247
<i>One Way Anova</i>					0,053
Densitas Kolagen	3,50±0,548	1,67±0,516	3,33±0,516	2,67±1,033	
<i>Saphiro Wilk</i>	0,004	0,001	0,001	0,473	
<i>Levene's Test</i>					0,238
<i>Kruskal Wallis</i>					0,04

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1. Rerata ekspresi MMP-1 di kelompok kontrol negatif (K2) yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi MMP-1 kelompok K4, selanjutnya rerata ekspresi MMP-1 kelompok K3 dan terendah rerata ekspresi MMP-1 kelompok kontrol normal (K1). Data ekspresi MMP-1 keempat kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $P > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* sebesar $P > 0,05$. Distribusi dan varian data ekspresi MMP-1 homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $P = 0,053$ sehingga dinyatakan tidak terdapat perbedaan ekspresi MMP-1 yang bermakna di antara keempat kelompok.

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1. Rerata densitas Kolagen di kelompok kontrol normal (K1) yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata densitas Kolagen kelompok K3, selanjutnya rerata densitas Kolagen kelompok K4 dan terendah rerata densitas Kolagen kelompok kontrol negatif (K2). Data densitas kolagen keempat kelompok tidak semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ untuk kelompok K4 dan $P < 0,05$ untuk kelompok kontrol normal, kontrol negatif dan kelompok K3. Varian data homogen

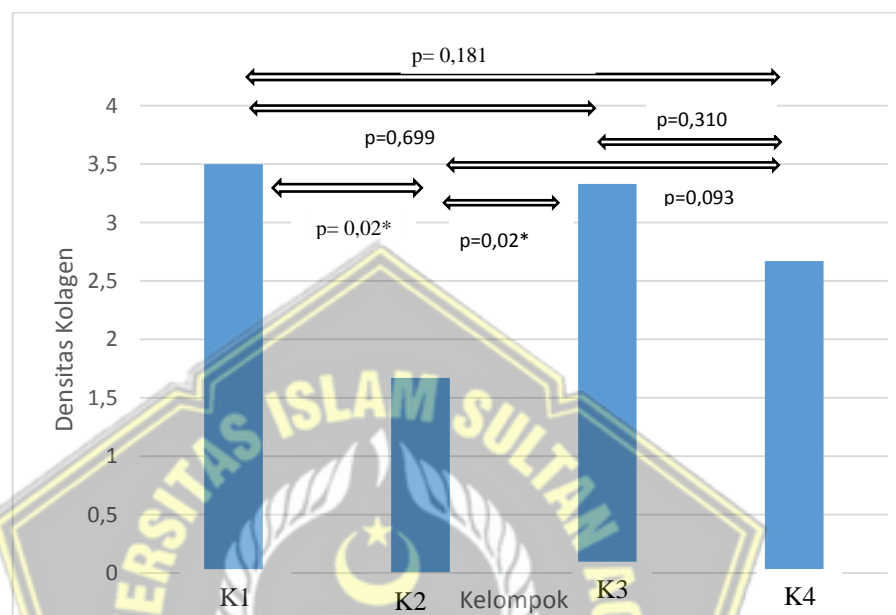
ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* sebesar $P > 0,05$. Selanjutnya dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $P = 0,04$ ($P < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan densitas Kolagen yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat dosis Pegagan (*Centella Asiatica*) yang paling berpengaruh.

Tabel 5.2. Uji Mann Whitney densitas Kolagen antar kelompok penelitian

	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Densitas Kolagen	K1	K2	0,02*
		K3	0,699
		K4	0,180
	K2	K3	0,02*
		K4	0,093
	K3	K4	0,310

Pada uji *Mann Whitney* diperoleh nilai $P < 0,05$ untuk perbandingan densitas Kolagen kelompok kontrol negatif ($P = 0,02$) dengan kelompok kontrol normal dan kelompok K3 ($P = 0,02$). Ini berarti ada perbedaan bermakna di antara kelompok-kelompok tersebut. Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan densitas Kolagen yang bermakna antara kelompok Mencit normal dengan kelompok Mencit dipapar UVB yang diolesi basis krim dan antara kelompok Mencit dipapar UVB dengan kelompok Mencit yang diberi dosis krim Pegagan (*Centella asiatica*) 10%. Pada dosis

krim Pegagan (*Centella asiatica*) 20% tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif dan kelompok K3.



Gambar 5.5. Uji *Mann Whitney* densitas Kolagen

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan paparan sinar UVB untuk menginduksi terjadinya fotoaging yang ditandai dengan terjadinya penurunan Kolagen pada dermis. Penyebab turunnya Kolagen dermis diantaranya adalah meningkatnya aktifitas MMP-1 yang dipicu oleh paparan sinar UVB. Paparan UVB meningkatkan produksi ROS di lapisan dermis, mengaktifkan jalur *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) sehingga meningkatkan pembentukan AP-1. AP-1 menstimulasi proses transkripsi enzim *Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1) yang berperan dalam degradasi kolagen. paparan UVB juga menginduksi aktivasi *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) yang merupakan faktor transkripsi

dalam respons inflamasi.⁷⁰ Ini menunjukkan bahwa paparan UVB secara langsung berhubungan dengan peningkatan ekspresi MMP-1 yang berperan dalam degradasi kolagen. ROS yang terjadi akibat paparan UVB juga dapat menyebabkan kerusakan DNA yang dapat mengakibatkan mutasi dan gangguan dalam regulasi genetik serta ekspresi gen. Kerusakan ini dapat mempengaruhi fungsi seluler, termasuk pada sel fibroblas yang bertanggung jawab atas produksi Kolagen, sehingga mengurangi sintesis Kolagen baru. Meningkatnya ekspresi MMP-1 oleh ROS melalui jalur transkripsi protein aktivator-1 (AP-1) dan kerusakan DNA yang diinduksi oleh UVB merupakan dimulainya pelepasan MMP-1.

Ekstrak daun Pegagan mengandung berbagai komponen bioaktif seperti *Polyfenol*, *Flavonoid*, *Carotene*, *Tannin*, vitamin C, dan *Triterpenoid* seperti *Asiaticoside*, *Madecassoside*, *Asiatic acid*, *Madecassic acid* yang berkhasiat sebagai antioksidan, antiinflamasi dan mencegah kerusakan DNA yang disebabkan karena kondisi stres oksidatif akibat kenaikan kadar ROS yang diinduksi oleh paparan sinar UVB. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa hasil analisis fitokimia daun Pegagan sebagai berikut :

Tabel 5.3. Kandungan Fitokimia Daun Pegagan.^{65, 83-84}

No.	Senyawa	Kandungan
1.	<i>Triterpenoid</i>	+ 18,89 µg/g
2.	<i>Flavonoid</i>	+ 2,59 µg/g
3.	<i>Polyfenol</i>	+ 18.87µg/g
4.	<i>Tannin</i>	+ 4.44 µg/g
5.	<i>Carotene</i>	+ 8,9 mg / 100 g
6.	Vitamin C	+ 1,3-7,7 mg/100 g

Triterpenoid, Flavonoid, Polyfenol, Tannin, Carotene, Vitamin C dalam daun Pegagan merupakan komponen bioaktif yang memiliki peran penting dalam memberikan efek antioksidan dan antiinflamasi. Kandungan tersebut juga berkontribusi pada kemampuan daun Pegagan untuk mencegah kerusakan DNA yang disebabkan oleh kondisi stres oksidatif, yang diinduksi oleh paparan sinar UVB. Efek antioksidan dan antiinflamasi membantu dalam mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan proses inflamasi, yang keduanya merupakan faktor penting dalam proses fotoaging dan degradasi kolagen dalam kulit. Dengan demikian, kandungan fitokimia dalam daun Pegagan berperan dalam menghambat aktivitas MMP-1, yang berperan dalam degradasi kolagen, dan mendukung pemeliharaan integritas struktural kulit.

Pada hasil penelitian, terdapat perbedaan signifikansi antara ekspresi MMP-1 dan densitas Kolagen. ekspresi MMP-1 mengalami kenaikan saat dipapar sinar UVB dan hanya diberi basis krim kemudian menurun pada perlakuan pengolesan krim ekstrak daun Pegagan 10% dan 20 %, bisa terlihat dari gambaran mikroskopik ekspresi MMP-1. Namun kenaikan dan penurunannya belum terjadi secara signifikan. Banyak faktor yang mempengaruhi hal ini dan merupakan keterbatasan dalam penelitian yang mempengaruhi hasil ekspresi MMP-1 seperti waktu penelitian yang singkat belum bisa untuk menilai ekspresi MMP-1 menjadi bermakna, variasi genetik dalam jalur perbaikan DNA atau respons stres sel memiliki perbedaan dalam ekspresi MMP-1.¹⁶ Variasi genetik individu Mencit

menghasilkan respon yang berbeda saat mendapat paparan UVB mempengaruhi hasil ekspresi MMP-1 yang melibatkan beberapa mekanisme genetik, Keterbatasan metodologis dalam penelitian seperti lokasi pengambilan sampel preparat MMP-1 yang tidak tepat di lokasi luka juga bisa mempengaruhi hasil yang didapat pada pemeriksaan ekspresi MMP-1 belum optimal seperti yang diharapkan. Dari sisi metode IHC (*Immunohistochemistry*) sebagai pilihan metode pemeriksaan MMP-1 dalam penelitian ini sudah cukup baik karena memungkinkan visualisasi langsung lokalisasi protein dalam jaringan. Namun, tentunya ada metode lain yang bisa memberikan informasi tambahan lebih mendalam seperti *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) atau *Western Blott* yang bisa memberikan informasi tentang ekspresi dan regulasi MMP-1 pada level genetik dan protein. Adapun hasil densitas Kolagen adalah bermakna. Hal ini menandakan yang berkontribusi untuk meningkatkan densitas Kolagen saat kulit terpapar UVB, tidak hanya dari inhibisi terhadap MMP-1. Ada jalur lain yang ikut mempengaruhi, sehingga hasil peningkatan densitas Kolagen bermakna.

Pada penelitian ini penilaian densitas Kolagen secara histologi dengan pewarnaan Sirius Red. Densitas Kolagen pada Mencit yang dipapar UVB mengalami penurunan dibandingkan Mencit normal tanpa paparan UVB. Hal ini menunjukkan bahwa faktor ROS yang terjadi akibat paparan UVB berperan dalam terjadinya kerusakan Kolagen pada kulit Mencit, terjadi stres oksidatif dan gangguan fungsi seluler termasuk sel- sel fibroblas yang

menyokong jaringan Kolagen. Setelah diolesi krim ekstrak daun Pegagan densitas Kolagen kembali mengalami peningkatan. Ini menunjukkan komponen fitokimia yang dikandung Pegagan bekerja secara optimal sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

Pada Penelitian krim ekstrak daun Pegagan 10% memberikan hasil yang lebih bermakna dibandingkan dengan dosis 20%. Hal ini menunjukkan dosis yang lebih tinggi tidak selalu berarti efeknya menjadi lebih baik. Faktor-faktor seperti penyerapan krim, mekanisme bioaktif dalam krim, dan potensi efek jenuh pada target biologis mungkin berperan. Dosis yang lebih tinggi tidak selalu meningkatkan efek terapeutik setelah mencapai titik tertentu karena batasan pada mekanisme penyerapan atau karena sel target sudah jenuh dengan komponen aktif. Selain itu, komponen bioaktif dalam ekstrak daun Pegagan, seperti *Polyfenol*, *Flavonoid*, *Carotene*, *Tannin*, vitamin C, dan *Triterpenoid*, bisa jadi memiliki efek optimal pada konsentrasi tertentu dan tidak linear dengan peningkatan dosis. Pada penelitian ini ternyata dengan peningkatan dosis krim Pegagan menjadi 20% hasilnya tidak lebih baik dalam meningkatkan densitas Kolagen daripada krim Pegagan 10%.

Penelitian terdahulu tentang krim ekstrak daun Pegagan menyebutkan pemberian krim ekstrak daun Pegagan 10% memberikan efek peningkatan Kolagen terbaik dan pada penelitian ini dosis krim Pegagan 10% masih yang terbaik untuk memberikan efek peningkatan Kolagen pada kulit yang dipapar UVB.⁸

Dengan adanya pemaparan sinar UVB pada kulit Mencit, perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh krim ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap mekanisme genetik lain yang mempengaruhi ekspresi MMP-1 dan mekanisme lain selain inhibisi MMP-1 yang berhubungan dengan peningkatan Kolagen.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Pemberian krim Pegagan 10 % dan 20 % tidak berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ekspresi MMP-1 pada Mencit balb C jantan yang dipapar UVB dibandingkan kelompok kontrol (sig P=0,053) namun gambaran mikroskopik tampak perbaikan berupa penurunan ekspresi MMP-1 pada Mencit yang diberi krim Pegagan 10 % dan 20 %.
2. Pemberian krim Pegagan 10 % dan 20 % berpengaruh secara signifikan meningkatkan densitas Kolagen pada Mencit balb C jantan yang dipapar UVB dibandingkan kelompok kontrol (sig P=0,04).

6.2. Saran

1. Pada penelitian selanjutnya waktu penelitian dilakukan lebih lama untuk menilai efek kronis dan dosis krim ekstrak daun Pegagan paling tinggi yang digunakan adalah 10%.
2. Penelitian lebih diperluas dengan kombinasi krim Pegagan dengan bahan alami lainnya seperti Vitamin C untuk sinergi efek yang lebih baik.
3. Perlu dilakukan pemeriksaan ekspresi MMP-1 yang lebih mendalam sampai ke level genetik untuk deteksi yang lebih akurat.

4. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk parameter lainnya yang membuat tingkat stres oksidatif menjadi lebih tinggi, seperti penurunan kadar *Superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione Peroxidase*
5. Penelitian dapat dilanjutkan pada fase klinis untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak daun Pegagan terhadap kulit manusia.



DAFTAR PUSTAKA

1. Dampati PS, Veronica E. Potensi Ekstrak Bawang Hitam sebagai Tabir Surya terhadap Paparan Sinar Ultraviolet. *KELUWIH J Kesehat dan Kedokt.* 2020;2(1):23-31. doi:10.24123/kesdok.v2i1.3020
2. Beckenbach L, Baron JM, Merk HF, Löffler H, Amann PM. Retinoid treatment of skin diseases. *Eur J Dermatology.* 2015;25(5):384-391. doi:10.1684/ejd.2015.2544
3. Djoko W, Taurhesia S, Djamil R, Simanjuntak P dkk. Standardisasi Ekstrak Etanol Herba Pegagan (Centella asiatica). *Sainstech Farma.* 2020;13(2):118-123.
<https://ejournal.istn.ac.id/index.php/sainstechfarma/article/view/765>
4. Purgiyanti., Heru Nurcahyo, Tya Muldiyana. ANA. Uji aktivitas antioksidan serum antiaging dari ekstrak Pegagan (Centella asiatica L Urban) Purgiyanti. *Suparyanto dan Rosad (2015.* 2020;5(3):248-253.
5. Sharma MR, Werth B, Werth VP. Nihms291225.Pdf. *Photochem Photobiol.* 2014;87(3):690-698. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00911.x.Animal
6. Hughes MCB, Williams GM, Pigeon H, Fourtanier A, Green AC. Dietary Antioxidant Capacity and Skin Photoaging: A 15-Year Longitudinal Study. *J Invest Dermatol.* 2021;141(4):1111-1118.e2. doi:10.1016/j.jid.2020.06.026
7. Respati RA, Yusharyahya SN, Wibawa LP, Widaty S. The Dermoscopic Features of Photoaging and Its Association with Sun Index Score in the Coastal Population at Cilincing, Jakarta: A Cross-Sectional Study. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022;15(May):939-946. doi:10.2147/CCID.S355260
8. Venesia F, Nikko F, Edy N, I Lister E. Effectiveness Test of Centella Asiatica Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (Rattus Norwegicus Wistar). *Technol Sci Am Sci Res J Eng.* 2020;65(1):98-107. <http://asrjetsjournal.org/>

9. Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, et al. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and balb C mice. *Nutrients*. 2020;12(2). doi:10.3390/nu12020411
10. Ruksiriwanich W, Khantham C, Sringarm K, Sommano S, Jantrawut P. Depigmented *Centella asiatica* extraction by pretreated with supercritical carbon dioxide fluid for wound healing application. *Processes*. 2020;8(3):1-15. doi:10.3390/pr8030277
11. Dian Aditya Putra K, Desya Pradnyaswari GA, Indra Setyawan E. Review Artikel Potensi Nanostructured Lipid Carrier (NLC) dengan Zat Aktif Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) sebagai Sediaan Topical Gel Anti-photoaging. *Work dan Semin Nas Farm 2022*. 2022;1(1):295-312.
12. Darmalaksana IGN, Sudimantini LM, Jayawarditha AAG, Dada IKA. Gerusan Daun Pegagan Mempercepat Kesembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih. *Bul Vet Udayana*. 2018;10(2):137. doi:10.24843/bulvet.2018.v10.i02.p06
13. Murlistyarini S, Dani AA. Peran Matriks Metaloproteinase (MMP) pada Proses Photoaging. *J Dermatology, Venereol Aesthetic*. 2022;3(1):13-22.
14. Fournière M, Bedoux G, Lebonvallet N, et al. Poly- and oligosaccharide *Ulva* sp. Fractions from enzyme-assisted extraction modulate the metabolism of extracellular matrix in human skin fibroblasts: Potential in anti-aging dermo-cosmetic applications. *Mar Drugs*. 2021;19(3). doi:10.3390/MD19030156
15. Gu Y, Han J, Jiang C, Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Res Rev*. 2020;59(February):101036. doi:10.1016/j.arr.2020.101036
16. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(11):3427-3431. doi:10.1111/jocd.14033

17. Krisnamurti GC, Sari DRT. Does Centella Asiatica Have Antiaging Activity in Skincare Products? . *Proc 2nd Int Conf Educ Technol (ICETECH 2021)*. 2022;630(Icetech 2021):240-245. doi:10.2991/assehr.k.220103.035
18. Tu Y, Quan T. Oxidative stress and human skin connective tissue aging. *Cosmetics*. 2016;3(3):1-12. doi:10.3390/cosmetics3030028
19. Kim JM, Kim S young, Noh EM, et al. Reversine inhibits MMP-1 and MMP-3 expressions by suppressing of ROS/MAPK/AP-1 activation in UV-stimulated human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2018;27(3):298-301. doi:10.1111/exd.13494
20. Wahyono P. The Prevention against Photoaging on Skin as an Effect of UV-B Radiation by Using Tomatoe (Lycopersicum Pyriforme) Juice. 2018;231(Amca):587-590. doi:10.2991/amca-18.2018.163
21. Arifa M, Rahayu A, Indrawati D. 13258-24641-1-Pb. 2014;15(4):530-540.
22. Scuron MD, Fay BL, Connell AJ, Peel MT, Smith PA. Ruxolitinib Cream Has Dual Efficacy on Pruritus and Inflammation in Experimental Dermatitis. *Front Immunol*. 2021;11(February):1-11. doi:10.3389/fimmu.2020.620098
23. Yusharyahya SN. Mekanisme Penuaan Kulit sebagai Dasar Pencegahan dan Pengobatan Kulit Menua. *eJournal Kedokt Indones*. 2021;9(2):150. doi:10.23886/ejki.9.49.150
24. Her Y, Shin BN, Lee YL, et al. Oenanthe javanica extract protects mouse skin from UVB radiation via attenuating collagen disruption and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1-12. doi:10.3390/ijms20061435
25. Li C, Fu Y, Dai H, Wang Q, Gao R, Zhang Y. Recent progress in preventive effect of collagen peptides on photoaging skin and action mechanism. *Food Sci Hum Wellness*. 2022;11(2):218-229. doi:10.1016/j.fshw.2021.11.003
26. Boo YC. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. *Antioxidants*. 2022;11(9). doi:10.3390/antiox11091663

27. Ahmad Z, Damayanti. Penuaan Kulit : Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berk Ilmu Kesehat Kulit dan Kelamin – Period Dermatology Venereol.* 2018;30(03):208-215.
[http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis](http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan%20Kulit%3A%20Patofisiologi%20dan%20Manifestasi%20Klinis)
28. Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2016;31(November):36-54. doi:10.1016/j.arr.2016.08.001
29. Studi P, Dokter P, Kedokteran F, et al. terhadap deposisi Kolagen pada Hepar Tikus model menopause. 2023;12(5):2-5.
30. Soejanto AS. Pemberian Krim Ekstrak Metanolik Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Menghambat Penurunan Jumlah Kolagen Dermis Kulit Mencit (*Mus gusculus*) Yang *IJAAM (Indonesian J Anti-Aging Med.* 2017;(September). <https://ijaam-unud.org/ojs/index.php/ijaam/article/view/5>
31. Damayanti, Prakoeswa CRS, Purwanto DA, et al. Wistar Rat as Photoaging Mouse Model. *J Pakistan Assoc Dermatologists.* 2023;33(1):24-29.
32. Yuwanda A, Rahmawati D, Anjani FS. Formulasi Dan Evaluasi Aktivitas Antioksidan Pada Sediaan Krim Wajah dari Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica L .*). 2023;1(1):9-16.
33. Assumpção CF, Hermes VS, Pagno C, et al. Phenolic enrichment in apple skin following post-harvest fruit UV-B treatment. *Postharvest Biol Technol.* 2018;138:37-45. doi:10.1016/j.postharvbio.2017.12.010
34. Cavinato M, Waltenberger B, Baraldo G, Grade C, Stuppner H, Jansen-Dürr P. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology.* 2017;18. doi:10.1007/s10522-017-9715-7
35. Faisal M, Juswono UP, Santoso DR. The dielectric properties of skin damage and its correlation to free radical intensity caused by UVA/UVB radiation impact. *J Phys Conf Ser.* 2022;2165(1). doi:10.1088/1742-6596/2165/1/012053

36. Huang Z, Chen Y, Zhang Y. Mitochondrial reactive oxygen species cause major oxidative mitochondrial DNA damages and repair pathways. *J Biosci.* 2020;45(1). doi:10.1007/s12038-020-00055-0
37. Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage: In vivo. *Chem Soc Rev.* 2021;50(15):8355-8360. doi:10.1039/d1cs00044f
38. Chouhan N, Yadav RM, Pandey J, Subramanyam R. High light-induced changes in thylakoid supercomplexes organization from cyclic electron transport mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2023;1864(1):148917. doi:10.1016/j.bbabi.2022.148917
39. Nakai K, Tsuruta D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *Int J Mol Sci.* 2021;22(19). doi:10.3390/ijms221910799
40. Rizi MR, Azizi A, Sayyari M, Mirzaie-Asl A, Conti L. Increased phenylpropanoids production in UV-B irradiated *Salvia verticillata* as a consequence of altered genes expression in young leaves. *Plant Physiol Biochem.* 2021;167:174-184. doi:10.1016/j.plaphy.2021.07.037
41. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* 2018;124:420-430. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016
42. Fernanda L, Ramadhani AP, Syukri Y. Aktivitas pegagan (*Centella asiatica*) pada dermatologi. *J Sains Farm Klin.* 2023;9(3):237. doi:10.25077/jsfk.9.3.237-244.2022
43. Tan SC, Bhattamisra SK, Chellappan DK, Candasamy M. Actions and therapeutic potential of madecassoside and other major constituents of *Centella asiatica*: A review. *Appl Sci.* 2021;11(18). doi:10.3390/app11188475
44. Musyarofah N, Susanto S, Aziz S a, Kartosoewarno S. Respon Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L . Urban) Terhadap Pemberian Pupuk Alami di Bawah Naungan. *Bul Agron.* 2007;224(35):217-224.

45. Zahara K. Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. *Pure Appl Biol.* 2014;3(4):152-159. doi:10.19045/bspab.2014.34004
46. Harun NH, Septama AW, Wan Ahmad WAN, Suppian R. The potential of *Centella asiatica* (Linn.) urban as an anti-microbial and immunomodulator agent: A review. *Nat Prod Sci.* 2019;25(2):92-102. doi:10.20307/nps.2019.25.2.92
47. Centella P, Urban L. Pegagan (*Centella asiatica*(L.) Urban). Published online 2018:3-4.
48. Kunjumon R, Johnson AJ, Baby S. *Centella asiatica*: Secondary metabolites, biological activities and biomass sources. *Phytomedicine Plus.* 2022;2(1):100176. doi:10.1016/j.phyplu.2021.100176
49. Tambunan GCA, Girsang E, Nasution AN. Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Peningkat Neovaskularisasi, Fibroblast dan Epitalisasi dalam Penyembuhan Luka Tikus Jantan. *Hijp Heal Inf J Penelit.* 2023;15. <https://myjournal.poltekkes-kdi.ac.id/index.php/hijp>
50. D. Rahmawati Y, Aulanni'am A, Prasetyawan S. Effects of Oral and Topical Application of *Centella asiatica* Extracts on The UVB-Induced Photoaging of Hairless Rats. *J Pure Appl Chem Res.* 2019;8(1):7-14. doi:10.21776/ub.jpacr.2019.008.01.430
51. Rahman M, Hossain S, Rahaman A, Fatima N, Nahar T, Uddin B. Antioxidant Activity of *Centella asiatica* (Linn .) Urban : Impact of Extraction Solvent Polarity. *J Pharmacogn Phytochem.* 2013;1(6):27-32.
52. Ramdan SRK, Purwanti D, Kurniasih N, Harun N. Formulasi dan nilai SPF formulasi krim tabir surya kombinasi ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L) dengan TiO₂. *Med Sains J Ilm Kefarmasian.* 2023;8(2):373-382. doi:10.37874/ms.v8i2.302
53. Padmiswari AAIM, Wulansari NT, Indrayoni P. Antioxidant activity test of combination of *Centella asiatica* leaf extract and mint leaf extract as an alternative herbal drink. *J Pijar Mipa.* 2023;18(1):126-129. doi:10.29303/jpm.v18i1.4520

54. Chen YN, Wu CG, Shi BM, Qian K, Ding Y. The protective effect of asiatic acid on podocytes in the kidney of diabetic rats. *Am J Transl Res.* 2018;10(11):3733-3741.
55. Hanifah M, Jufri M. Formulation and stability testing of nanoemulsion lotion containing centella asiatica extract. *J Young Pharm.* 2018;10(4):404-408. doi:10.5530/jyp.2018.10.89
56. Shen H, Zhu F, Li J, Tang S, Zhang Y, Zhang J. Protective effect of asiaticoside on radiation-induced proliferation inhibition and DNA damage of fibroblasts and mice death. *Open Life Sci.* 2020;15(1):145-151. doi:10.1515/biol-2020-0015
57. Shen X, Guo M, Yu H, Liu D, Lu Z, Lu Y. Propionibacterium acnes related anti-inflammation and skin hydration activities of madecassoside, a pentacyclic triterpene saponin from Centella asiatica. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(3):561-568. doi:10.1080/09168451.2018.1547627
58. Cahyani NA, Sastramihardja HS, Irasanti SN. Scoping Review: Efek Pegagan (Centella asiatica) dalam Sediaan Topikal terhadap Pencegahan Penuaan Dini. *Bandung Conf Ser Med Sci.* 2022;2(1):207-216. doi:10.29313/bcsms.v2i1.574
59. Sirichoat A, Chaijaroonkhanarak W, Prachaney P, et al. Effects of Asiatic acid on spatial working memory and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Nutrients.* 2015;7(10):8413-8423. doi:10.3390/nu7105401
60. Liu YT, Chuang YC, Lo YS, et al. Asiatic acid, extracted from centella asiatica and induces apoptosis pathway through the phosphorylation p38 mitogen-activated protein kinase in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. *Biomolecules.* 2020;10(2):1-13. doi:10.3390/biom10020184
61. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients.* 2018;10(11):1-23. doi:10.3390/nu10111618
62. Sarker U, Oba S. Polyphenol and flavonoid profiles and radical scavenging activity in leafy vegetable Amaranthus gangeticus. *BMC Plant Biol.*

- 2020;20(1):1-12. doi:10.1186/s12870-020-02700-0
63. Kandasamy A, Aruchamy K, Rangasamy P, et al. Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of Centella Asiatica Extracts: An Experimental and Theoretical Investigation of Flavonoids. *Plants*. 2023;12(20). doi:10.3390/plants12203547
 64. Agustiarini V, Fauziyah F, Wijaya DP. Pengaruh Pemberian Variasi Gula Pasir Pada Minuman Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Organoleptik dan Kadar β -Karoten. *J Penelit Sains*. 2020;22(3):162. doi:10.56064/jps.v22i3.598
 65. Mertz C. The nutrient content of two folia morphotypes of. 2019;19(3):14654-14673. doi:10.18697/ajfand.85.17750
 66. Shukri SM, Pardi F, Jaafar Sidik N. In Vitro Anti-Collagenase Activity and Total Phenolic Content Of Five Selected Herbs: A Review. *Sci Lett*. 2021;15(1):117. doi:10.24191/sl.v15i1.11812
 67. Mohiuddin AK. Skin Care Creams: Formulation and Use Related papers. *Dermatology Clin Res*. 2019;5(1):238-27. www.scitcentral.com
 68. Mutiarahmi CN, Hartady T, Lesmana R. Use of Mice As Experimental Animals in Laboratories That Refer To the Principles of Animal Welfare: a Literature Review. *Indones Med Veterinus*. 2021;10(1):134-145. doi:10.19087/imv.2020.10.1.134
 69. Yusuf M, Al-Gizar MR, Rorrong YYA, et al. Percobaan Memahami Perawatan Dan Kesejahteraan Hewan Percobaan. *Jur Biol FMIPA Prgram Stud Biol*. Published online 2022:1-109.
 70. Zhang M, Hwang E, Lin P, Gao W, Ngo HTT, Yi TH. *Prunella vulgaris* L. Exerts a Protective Effect Against Extrinsic Aging Through NF- κ B, MAPKs, AP-1, and TGF- β /Smad Signaling Pathways in UVB-Aged Normal Human Dermal Fibroblasts. *Rejuvenation Res*. 2018;21(4):313-322. doi:10.1089/rej.2017.1971
 71. Diniz LRL, Calado LL, Duarte ABS, de Sousa DP. Centella asiatica and Its Metabolite Asiatic Acid: Wound Healing Effects and Therapeutic Potential. *Metabolites*. 2023;13(2). doi:10.3390/metabo13020276

72. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J*. 2002;43(4):207-212. doi:10.1093/ilar.43.4.207
73. Sundawa AP, Trisnadi RA. Pengaruh Pemberian Vitamin C Dosis Tinggi Terhadap Kadar Tumor Necrosis Alfa pada Aktivitas Fisik Berat (Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Jantan). *Indones J Med Pharm Sci*. 2022;1(2):36-40. <https://doi.org/10.30659/ijmps.v1i2.90>
74. Qian D, Florenly F, Liena L, Purba DR. Effectiveness of Ethanol Extract Mangosteen Peel (*Garcinia Mangostana* L.) in Accelerating Post-Tooth Extraction Healing in Wistar Rats. *Budapest Int Res Exact Sci J*. 2021;4(1):22-30. doi:10.33258/birex.v4i1.3473
75. Monica Sandy, Siska Wardani T, Dwi Septiarini A. Uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi air daun Pegagan(*Centella asiatica* (L.) Urb) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. *Media Farm Indones*. 2021;16(2):1683-1692. doi:10.53359/mfi.v16i2.184
76. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-298. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25
77. Muhartono, Fiana D, Kurrahman G. Efek Perlindungan Madu terhadap Kerusakan Lambung Tikus yang diberi Etanol. *Medula*. 2013;1(2):72-78.
78. Yumas M. Formulasi sediaan krim wajah berbahan aktif Ekstra Metanol biji Kakao non fermentasi (*Theobroma cacao* L) kombinasi madu lebah. *J Ind Has Perkeb*. 2016;11(2):75. doi:10.33104/jihp.v11i2.3414
79. Sari N, Samsul E, Narsa AC. Pengaruh Trietanolamin pada Basis Krim Minyak dalam Air yang Berbahan Dasar Asam Stearat dan Setil Alkohol. *Proceeding Mulawarman Pharm Conf*. 2021;14:70-75. doi:10.25026/mpc.v14i1.573
80. Atina Husaana D. MS. A. Peran Protein Daun *Mirabilis jalapa* L Sebagai Kemoprevalensi Kanker Kulit: Penelusuran Mekanisme Antiinflamasi, Restorasi Supresi Imun dan Regulasi Apoptosis. *Perpust Univ Gadjah Mada*. Published online 2013:2013.

81. Azide S, Free T. Starr Trek Universal HRP Detection System Starr Trek Universal HRP Detection System Sodium Azide and Thimerosal Free. *Biocare*. Published online 2000:1-2.
82. Chen Y, Yu Q, Xu CB. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by imagej software. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(10):14904-14910.
83. Widyawati T, Syarifah S, Anggraini DR, Mustanti LF. Standardization and phytochemical screening of *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* L. leaf and *Spirulina* sp. *simplicia*. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;713(1). doi:10.1088/1755-1315/713/1/012039
84. CU ON, FU I, J A, OJ P, PH W. Nutrient and Phytochemical Composition of *Centella asiatica* Leaves. *Med Aromat Plants*. 2020;9(2). doi:10.35248/2167-0412.20.9.346

