

**PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella Asiatica*) DAN AIR ALKALI PER ORAL TERHADAP
KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN
INTERLEUKIN-10 (IL- 10)
(Penelitian Pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss*
yang Dipapar Sinar UVB)**

TESIS

Untuk Memenuhi Sebagai Persyaratan Guna Mencapai Derajat S-2



Megister Ilmu Biomedik

Eva Supartini

MBK 23.22.010384

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

2025

TESIS

**PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella Asiatica*) DAN AIR ALKALI PER ORAL TERHADAP
KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN
INTERLEUKIN-10 (IL- 10)
(Penelitian Pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss*
yang Dipapar Sinar UVB)**

Disusun Oleh :

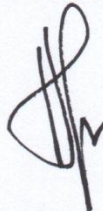
Eva Supartini

MBK 23.22.010384

Telah dipertahankan di depan Penguji
pada tanggal 20 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

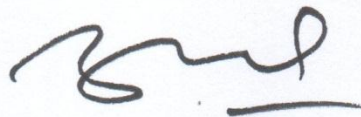
Menyetujui,

Pembimbing I,



Dr. dr. Chodidjah, M.Kes
NIK. 210.186023

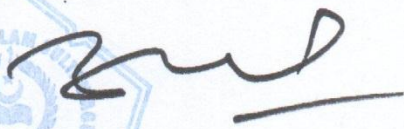
Pembimbing II,



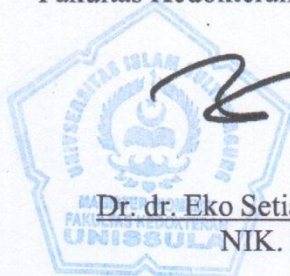
Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS
NIK. 210.113160

Mengetahui,

Ketua Program Studi Megister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS
NIK. 210.113160



PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya 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, 26 Juli 2024



Eva Supartini

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella Asiatica*) DAN AIR ALKALI PER ORAL TERHADAP KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN INTERLEUKIN - 10 (IL- 10) (Penelitian Pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss* Yang Dipapar Sinar UVB)**. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

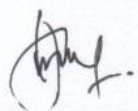
Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada :

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 Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibono, M.Kes., Dr. dr. Hadi Sarosa, M,Kes., dan Prof Siti Thomas Z. SKM, M.Kes., selaku penguji yang telah memberikan masukan, meluangkan waktu serta semangat dalam selama menyelesaikan tesis ini.
7. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak. Aamiin yaa Rabbal alamin.

Semarang, September 2024


(Eva Supartini)

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan kronik sinar *Ultraviolet B* (UV-B) menyebabkan *collagen loss* akibat penurunan ekspresi enzim antioksidan SOD dan memicu inflamasi akibat penurunan kadar sitokin anti-inflamasi IL-10.

Tujuan : untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali terhadap kadar SOD dan IL-10 pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.

Metode: Penelitian merupakan penelitian eksperimental *in-vivo* yang menggunakan rancangan penelitian berupa *posttest only control group* dengan metode rancang acak lengkap. Subjek penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram. Tikus putih jantan Galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus kontrol negatif dengan paparan UV-B), K2 (tikus kontrol positif yang dipapar UV-B dan diberi perlakuan hyaluronic acid), K3 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan gel ekstrak daun pegagan 10%), K4 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan air alkali secara peroral) dan K5 (tikus dipapar UV-B dengan perlakuan kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali). Analisis kadar SOD dan IL-10 dilakukan dengan metode ELISA yang dilanjutkan dengan analisis uji statistik deskriptif dilanjutkan dengan uji normalitas dan homogenitas, dan uji parametrik dengan one way ANOVA.

Hasil: Kadar SOD pada K1 $71,978 \pm 40,723$ pg/ml, K2 $132,248 \pm 9,778$, K3 $135,773 \pm 15,082$, K4 $132,615 \pm 14,037$ dan K5 $132,897 \pm 6,572$. Analisis K1 terdapat perbedaan signifikan terhadap K2, K3, K4 dan K5 ($p < 0,05$). Kadar IL-10 pada K1 $4,2773 \pm 2,8268$, K2 $6,3023 \pm 2,7616$, K3 $7,7418 \pm 1,1568$, K4 $7,3365 \pm 0,9780$ dan K5 $8,4710 \pm 0,7312$. Analisis K1 terdapat perbedaan signifikan terhadap K3, K4 dan K5 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstra daun pegagan dan air alkali per oral terhadap kadar SOD dan IL-10 pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

Kata Kunci: daun pegagan, air alkali, IL-10, SOD, *collagen loss*

ABSTRACT

Background: Chronic exposure to Ultraviolet B (UV-B) radiation leads to collagen loss through decreased expression of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and triggers inflammation by reducing levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10).

Objective: To investigate the effects of combined *Centella asiatica* leaf extract gel and alkaline water treatment on SOD and IL-10 levels in UV-B-induced collagen loss in a rat model.

Methods: This in-vivo experimental study employed a posttest-only control group design with a completely randomized method. Male Wistar rats aged 2-3 months weighing 200-250 grams were used as subjects. The rats were divided into five groups: K1 (negative control group exposed to UV-B), K2 (positive control group exposed to UV-B and treated with hyaluronic acid), K3 (UV-B exposure with 10% *Centella asiatica* leaf extract gel treatment), K4 (UV-B exposure with oral alkaline water treatment), and K5 (UV-B exposure with combined treatment of *Centella asiatica* leaf extract gel and alkaline water). SOD and IL-10 levels were analyzed using ELISA method, followed by descriptive statistical analysis, normality and homogeneity tests, and parametric analysis using one-way ANOVA.

Results: The SOD levels were 71.978 ± 40.723 pg/ml in K1, 132.248 ± 9.778 in K2, 135.773 ± 15.082 in K3, 132.615 ± 14.037 in K4, and 132.897 ± 6.572 in K5. Statistical analysis showed a significant difference in SOD levels between K1 and K2, K3, K4, and K5 ($p < 0.05$). The IL-10 levels were 4.2773 ± 2.8268 in K1, 6.3023 ± 2.7616 in K2, 7.7418 ± 1.1568 in K3, 7.3365 ± 0.9780 in K4, and 8.4710 ± 0.7312 in K5. Statistical analysis showed a significant difference in IL-10 levels between K1 and K3, K4, and K5 ($p < 0.05$).

Conclusion: The effect of topical gel containing gotu kola (*Centella Asiatica*) leaf extract and oral alkaline water administration on increasing SOD and IL-10 levels in wistar rats with collagen loss induced by UVB exposure.

Keywords: *Centella Asiatica*, alkaline water, IL-10, SOD, collagen loss

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1. Manfaat Teoritis	6
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
1.5. Originalitas Penelitian	7
BAB II TINJUAN PUSTAKA	10
2.1. <i>Superoksida Dismutase</i> (SOD)	10
2.1.1. Fungsi dan Mekanisme Kerja.....	10
2.1.2. Peningkatan Kadar SOD	12
2.1.3. Pengukuran SOD.....	13
2.2. <i>Interleukin-10</i> (IL-10)	15
2.3. Tumbuhan Pegagan.....	16

2.3.1. Definisi Daun Pegagan (<i>Centella Asiatica</i>).....	16
2.3.2. Kandungan Bahan Aktif Daun Pegagan (<i>Centella Asiatica</i>) ..	19
2.4. Air Alkali	20
2.4.1. Kandungan Kimia Air Alkali	22
2.5. Ultraviolet B	23
2.6. <i>Collagen loss</i>	25
2.6.1. Mekanisme <i>collagen loss</i>	25
2.7. Gambaran Histologi Kulit	26
2.7.1. Epidermis.....	27
2.7.2. Dermis	28
2.7.3. Hipodermis (Subkutis)	29
2.8. Pengaruh Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap kadar IL-10 dan SOD pada <i>Collagen loss</i>	31
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	33
3.1. Kerangka Teori.....	33
3.2. Kerangka Konsep	36
3.3. Hipotesis.....	36
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	37
4.2. Subjek dan Sampel Penelitian	38
4.2.1. Subjek Penelitian.....	38
4.2.2. Sampel Penelitian	38
4.2.3. Besar Sampel.....	39
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	40
4.3.1. Variabel Penelitian	40
4.3.2. Definisi Operasional.....	40
4.4. Peralatan Penelitian	42

4.4.1. Peralatan Ekstraksi	42
4.4.2. Peralatan untuk Pembuatan Gel	43
4.4.3. Peralatan untuk Pemeliharaan Tikus	43
4.4.4. Peralatan Pendukung.....	44
4.5. Cara Penelitian	44
4.5.1. <i>Ethical clearance</i>	44
4.5.2. Prosedur Pembuatan Ekstrak.....	44
4.5.3. Pembuatan Gel	46
4.5.4. Penetapan Dosis	47
4.5.5. Pembagian Kelompok	47
4.5.6. Penyinaran UVB pada subjek penelitian.....	47
4.5.7. Validasi Hewan Coba.....	48
4.5.8. Pengambilan Sampel Jaringan Kulit	49
4.5.9. Analisis SOD dan IL-10	50
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	53
4.7. Analisa Data	53
4.8. Alur Penelitian	54
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	55
5.1. Hasil Penelitian	57
5.1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap Kadar IL-10	57
5.1.2. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap Kadar SOD	60
5.2. Pembahasan.....	62
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	67
6.1. Kesimpulan	67
6.2. Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	77

DAFTAR SINGKATAN

DAMP	: <i>Damage Associated Molecular Patter</i>
TLR4	: <i>Toll Like Receptor 4</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EC-SOD	: <i>Extracellular Superoxide Dismutase</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GERD	: <i>Gastroesophageal Reflux Disease</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
H ₂ O	: <i>Air</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
IL 1	: <i>Interleukin 1</i>
IL 6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
JAK1	: <i>Janus kinase 1</i>
M2	: <i>Macrophage 2</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activation Protein Kinase</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
NFK β	: <i>Nuklear Factor Kappa Beta</i>
M1	: <i>Macrophage 1</i>
Mn-SOD	: <i>Manganese Superoxide Dismutase.</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NBT	: <i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
O ₂	: <i>Oksigen</i>
ORP	: <i>Oksidation Reduction Potential</i>
PTEEN	: <i>Phosepatashe and Tensin Homolog</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoksida Dismutase</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>

TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Betta</i>
Th2	: <i>T-helper 2</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TYK2	: <i>Tyrosine kinase 2</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>



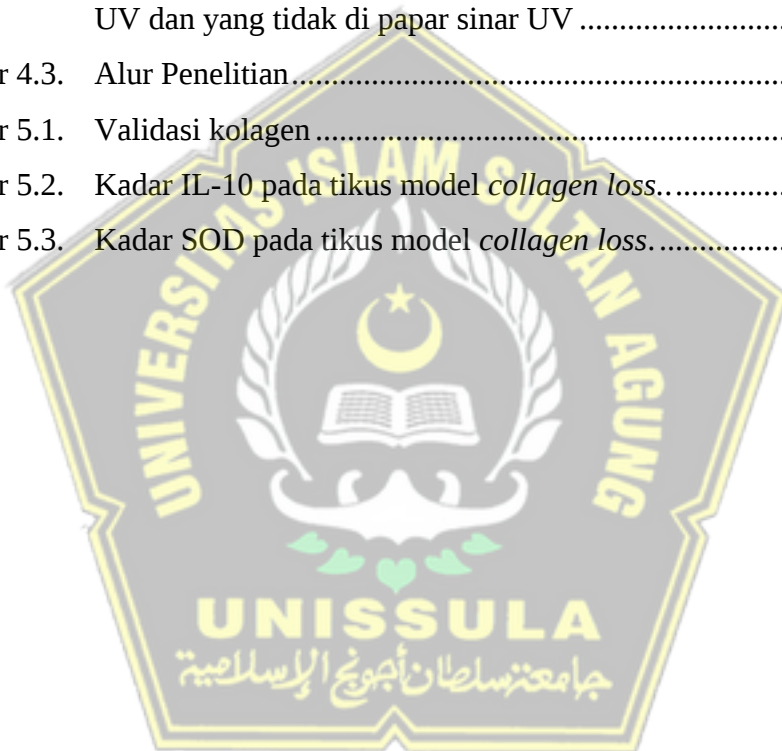
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	7
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Kadar IL-10.....	57
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi kadar IL-10 antara kelompok penelitian	59
Tabel 5.3.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Kadar SOD.....	60
Tabel 5.4.	Perbedaan kadar SOD antara kelompok penelitian	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Daun Pegagan (<i>Centella Asiatica</i>).....	19
Gambar 2.2.	Gambaran Histologi Kulit.....	31
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	35
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep.....	36
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian.....	37
Gambar 4.2.	Pengecatan Masson Trichrome pada tikus yang di papar sinar UV dan yang tidak di papar sinar UV	49
Gambar 4.3.	Alur Penelitian.....	54
Gambar 5.1.	Validasi kolagen	56
Gambar 5.2.	Kadar IL-10 pada tikus model <i>collagen loss</i>	59
Gambar 5.3.	Kadar SOD pada tikus model <i>collagen loss</i>	62



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical clearance</i>	77
Lampiran 2. Analisis Statistik	78
Lampiran 3. Surat Keterangan Penelitian	82
Lampiran 4. Hasil Analisi	83
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	87



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan Ultraviolet B (UVB) 280-320nm merupakan salah satu penyebab utama faktor lingkungan yang memicu kerusakan di kulit seperti *sunburn* dan *photodamage*.^{1,2} Sinar UVB akan menyebabkan peningkatan konsentrasi *reactive oxygen spesies* (ROS) akan memicu peradangan dan mengaktivasi sitokin pro- inflamasi seperti *interleukin-6*.³ Peningkatan sitokin IL-6 dapat menginduksi kaskade sekunder mediator keratinosit yang menyebabkan *apoptosis* melalui induksi caspase-3 sehingga terjadinya penurunan produksi kolagen pada sel kulit.⁴ UVB dapat menginduksi *apoptosis* sel keratinosit yang sering disebut sebagai *sunburn* melalui mengelompokkan reseptor *apoptosis* dan p53.^{5,6} Penelitian yang dilakukan oleh Nikko Fernando *et al* didapatkan dengan 10% krim ekstrak *Centella Asiatica* didapatkan meningkatnya *collagen* 77.89% dan kelembaban naik menjadi 81,58%.²⁷ Penelitian lainya ditemukan bahwa ekstrak daun pegagan dosis 200mg/kgBB memiliki aktivitas antiinflamasi yaitu IL-10 dan antioksidan dengan menurunkan kadar sitokin *pro inflamasi* serta ROS.⁷

Populasi Asia Tenggara salah satunya Indonesia yang dilalui garis khatulistiwa paparan sinar matahari akan cukup kuat. *Sunburn* pada manusia lebih sering terjadi pada orang yang memiliki tipe kulit terang dan pada orang-orang yang tinggal lebih dekat dengan garis ekuator yang menyebabkan sekitar 50% memiliki riwayat sengatan matahari akut. Di

Amerika prevalensi sengatan matahari dalam 1 tahun adalah 13% pada orang Amerika berkulit hitam dan 30% pada orang Amerika Hispanik.⁸ Penelitian terhadap 31.162 sample orang dewasa pada tahun 2015 mengungkapkan bahwa 34% peserta pernah mengalami setidaknya satu kali sengatan UVB. Individu dengan tipe kulit Fitzpatrick I hingga III dengan warna kulit lebih terang, mereka yang berusia 18 hingga 29 tahun, dan individu berkulit putih non-Hispanik menunjukkan kemungkinan lebih tinggi mengalami sengatan matahari saat melakukan aktivitas di luar ruangan dengan paparan paparan UV tahunan pasien sebesar 30% hingga 50%.⁹

Populasi akan memiliki kulit yang lebih gelap akibat paparan UVB yang cukup tinggi yang akan diawali dengan proses inflamasi, hiperpigmentasi ataupun *photodamage*. Sekitar 40% - 50% perempuan serta 20% - 40% laki-laki usia 24 – 29 tahun menderita *photodamage*. Prevalensi *photodamage* pada perempuan dewasa sekitar 70% dan laki-laki dewasa sekitar 60%.⁹ Pencegahan paparan UVB saat ini banyak menggunakan bahan kosmetika kimia dan fisik untuk melindungi kulit dari dampak paparan UVB akut. Bahan kimia yang terkandung di dalam kosmetik merupakan senyawa aromatik dengan gugus karbonil dan dapat mengiritasi terutama pada kulit sensitif. Penggunaan senyawa alami sangat diperlukan dalam mengatasi permasalahan paparan UVB akut dengan minimal efek samping.^{10,11,12}

Melalui aktivitasnya, enzim SOD mengendalikan kadar berbagai *spesies oksigen reaktif* (ROS) dan spesies nitrogen reaktif, sehingga membatasi potensi toksisitas molekul SOD mengkatalisis konversi superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Anion superoksida adalah produk yang dimaksudkan dari enzim pensinyalan khusus serta produk sampingan dari beberapa proses metabolisme termasuk respirasi mitokondria.¹⁸

Semua organisme aerobik memiliki beberapa protein SOD yang ditargetkan ke lokasi seluler dan subseluler yang berbeda, yang mencerminkan difusi yang lambat dan berbagai sumber substrat superoksida mereka. Kompartemenisasi ini juga menunjukkan perlunya kontrol lokal yang baik terhadap pensinyalan ROS dan kemungkinan ROS untuk memberi sinyal antar kompartemen. Dalam tinjauan ini, kami membahas studi pada organisme model dan manusia, yang mengungkapkan peran ganda enzim SOD dalam mengendalikan kerusakan dan mengatur pensinyalan.^{18,19}

Saat ini *Hyaluronic acid* atau dikenal dengan HA merupakan bahan yang berharga untuk memperbaiki penampilan wajah pada wanita dengan kulit yang tidak kenyal, kulit yang kurang terhidrasi, dan penuaan dini.²¹ HA telah digunakan baik secara topikal maupun oral untuk memperbaiki penampilan. HA bersifat multifungsi, bahkan memiliki peran dalam modulasi kekebalan pada penyakit dan sebagai perawatan pascaprosedur dalam pelapisan ulang wajah.^{20,22} Perubahan terjadi pada HA seiring

bertambahnya usia sehingga pelembab berbasis HA dapat memperbaiki kondisi kulit yang mengalami penuaan akibat paparan UVB melalui aplikasi topikal.^{73,23}

Efek melembabkan dan sebagai anti inflamasi juga ditemukan pada tanaman pegagan yang telah banyak diteliti diberbagai jenis penyakit kulit seperti psoriasis dan hiperpigmentasi.¹³ Mekanisme pegagan sebagai antiinflamasi melalui senyawa aktifnya, *flavonoid*, *terpenoid*, *alkaloid*, *tannin*, dan *saponin*.¹⁴ Kandungan flavonoid pada pegagan (*Centella Asiatica* L.) berpotensi untuk melindungi dari sinar matahari, potensi tersebut disebabkan karena adanya gugus kromofor dengan sistem aromatik terkonjugasi yang dapat menyerap sinar UV A dan UV B.²⁹ Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak daun pegagan menekan ROS dengan nilai IC₅₀ 31.09 ug/mL secara invitro.¹⁶ Ekstrak pegagan juga telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi melalui regulasi jalur JAK/STAT3.¹³

Penelitian sebelumnya juga telah melaporkan bahwa *Centella Asiatica* melindungi terhadap kerusakan keratinosit HaCaT yang diinduksi UVB melalui perubahan ekspresi mikroRNA.¹⁷ Agen inflamasi yang muncul akibat paparan UVB akan berdampak pada *collagen loss* atau produksi kolagen yang menurun, penelitian oleh Bagjai *et al* menemukan bahwa Air alkali dengan pH basa (8-10) akan menimbulkan mekanisme pengikatan H₂ dapat menciptakan proses ORP serta dapat menstimulus TNF- α yang menghasilkan IL-4 sehingga diproduksi M2 dan menghasilkan IL-10

sebagai anti Inflamasi.¹⁵ Air alkali dapat mengurangi stres oksidatif dan peradangan dalam tubuh. Sifat antioksidan yang dimiliki oleh air alkali mampu menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif, yang dapat menyebabkan penuaan dini dan penyakit degeneratif. Air alkali juga berpotensi meningkatkan kadar SOD, karena kemampuannya dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif.⁶⁵ Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan mengkaji lebih lanjut Kadar SOD dan IL-10 pada tikus wistar yang dipapar UVB dan diberikan Ekstrak Daun Pegagan 10% dan Air Alkali.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel Ekstrak Daun Pegagan dan air alkali secara oral terhadap kadar *superoksida dismutase* (SOD) dan *Interleukin-10* (IL-10) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian gel Ekstrak Daun Pegagan dan air alkali secara oral terhadap kadar *superoksida dismutase* (SOD) dan *Interleukin-10* (IL-10) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun

Pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun Pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap *Interleukin - 10* (IL - 10) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat yang diberikan dari penelitian ini adalah memberikan ilmu pengetahuan terkait peran pemberian gel ekstrak daun pegagan dan air alkali secara oral terhadap kadar SOD dan IL-10 pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan terapi alternatif menggunakan kombinasi gel ekstrak daun pegagan (*centella asiatica*) dan air alkali secara oral untuk mengatasi masalah kesehatan terkait kerusakan kolagen.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Tahun	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Fernando Venesia, N., Fachrial, E., Nyoman, I., & Lister, E.. ²⁷	2020	Effectiveness Test of Centella Asiatica Ekstrak on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (Rattus Norwegicus Wistar)	Experimental Design	Krim ekstrak <i>Centella Asiatica</i> 10% menunjukkan peningkatan kadar kolagen tertinggi dengan rata-rata 77,89% dan rata-rata hidrasi sebesar 81,58%
Chee Kong Yap et al. ²⁸	2021	Antioxidant Enzyme Activities as Biomarkers of Cu and Pb Stress in <i>Centella Asiatica</i>	Eksperimental hidroponik	Peningkatan aktivitas enzim antioksidan pada <i>Centella Asiatica</i> saat terpapar Cu dan Pb dapat digunakan sebagai indikator bahwa <i>Centella Asiatica</i> dapat menghambat stres oksidatif.
Boju Sun et al. ²⁹	2020	Therapeutic Potential of <i>Centella Asiatica</i> and Its Triterpenes: A Review	Tinjauan literatur	Kandungan triterpenoid pada <i>Centella Asiatica</i> memiliki efek antara lain antiinflamasi, antiapoptotik, antioksidatif, dan meningkatkan fungsi mitokondria, sehingga menguntungkan untuk penyakit neurologis dan kulit
Suvesh Munakarmi et al. ³⁰	2023	Synergistic Effects of Vitis vinifera L. and <i>Centella Asiatica</i> against CCl4-Induced Liver Injury in Mice	Eksperimental, analisis biokimia	Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak VE (<i>Vitis Vinifera</i>) dan CE (<i>Centella Asiatica</i>) memiliki efek sinergis dalam melindungi hati terhadap ROS yang diinduksi CCl 4 , stres

				oksidatif, dan peradangan.
Poungrat Pakdeechote <i>et al.</i> ³¹	2014	Asiatic Acid Alleviates Hemodynamic and Metabolic Alterations via Restoring eNOS/iNOS Expression	Eksperimental pada tikus	asam asiatic dapat meringankan kelainan metabolik yang didukung oleh pengurangan plasma TNF- α sebagai penanda inflamasi, pada tikus yang diinduksi tinggi lemak dan tinggi gula serta telah mengalami test toleransi gula terganggu
Mihyun Lee <i>et al.</i> ²⁶	2023	Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults	Randomized, controlled, crossover, double-blind clinical trial	Penelitian ini menunjukkan bahwa konsumsi air alkali-reduksi (ARW) dengan dosis 10 mL/kg berat badan dan pH 9,5 efektif untuk stabilisasi pasca latihan otot didapat penurunan kadar MDA setelah pemberian ARW setelah latihan. Temuan ini menunjukkan bahwa ARW menunjukkan aktivitas antioksidan yang mencegah peroksidasi lipid dan melindungi tubuh dari stres oksidatif setelah latihan yang melelahkan.

Penelitian terkait Daun Pegagan menunjukkan berbagai efek positif, terutama dalam mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD). Sebagai contoh, Penelitian oleh Niko Fernando *et al* menemukan Hasilnya menunjukkan krim ekstrak *Centella Asiatica* 10% menunjukkan peningkatan kadar kolagen tertinggi dengan rata-rata 77,89% dan rata-rata hidrasi sebesar 81,58%. Krim *Centella Asiatica* 2,5% menunjukkan peningkatan terendah kadar kolagen rata-rata 21,12% dan hidrasi rata-rata 39,40%. Chee Kong Yap *et al.* (2021) menunjukan Cu dan Pb meningkatkan aktivitas enzim

antioksidan (APX, CAT, GPX, SOD) pada *Centella Asiatica* yang mengalami stres akibat paparan logam. Kajian oleh Boju Sun *et al.* (2020) juga menyoroti potensi terapeutik *Centella Asiatica* dalam berbagai penyakit, terutama pada sistem neurologis dan kulit.^{27,28,29}

Dalam konteks studi eksperimental lainnya, Suvesh Munakarmi *et al.* (2023) menunjukkan bahwa Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak VE (*Vitis Vinifera*) dan CE (*Centella Asiatica*) memiliki efek sinergis dalam melindungi hati terhadap ROS yang diinduksi CCl₄, stres oksidatif, dan peradangan. Poungrat Pakdeechote *et al.* (2014) menunjukkan bahwa asam asiatik dapat meringankan kelainan metabolik yang didukung oleh pengurangan plasma TNF- α sebagai penanda inflamasi, pada tikus yang diinduksi tinggi lemak dan tinggi gula serta telah mengalami test toleransi gula terganggu. Sebuah penelitian oleh Mihyun Lee *et al.* (2023) menunjukkan bahwa konsumsi air alkali-reduksi (ARW) dengan dosis 10 mL/kg berat badan dan pH 9,5 efektif untuk stabilisasi pasca latihan otot didapat penurunan kadar MDA setelah pemberian ARW setelah latihan. Temuan ini menunjukkan bahwa ARW menunjukkan aktivitas antioksidan yang mencegah peroksidasi lipid dan melindungi tubuh dari stres oksidatif setelah latihan yang melelahkan. Unsur kebaruan (novelty) dari penelitian ini adalah kombinasi penggunaan gel topikal ekstrak pegagan dengan pemberian air alkali secara oral untuk melihat efek terhadap kadar SOD dan IL-10 pada kondisi spesifik seperti tikus *collagen loss* pada tikus.^{26,30,31}

BAB II

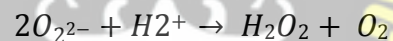
TINJUAN PUSTAKA

2.1. *Superoksida Dismutase (SOD)*

Superoksida dismutase (SOD) adalah enzim yang memainkan peran penting dalam sistem pertahanan antioksidan tubuh. Enzim ini melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas superoksida (O_2^-). Radikal bebas superoksida adalah produk sampingan dari proses metabolisme normal, yang dapat menjadi sangat reaktif dan merusak komponen seluler seperti DNA, protein, dan lipid membran jika tidak dinetralkan.³²

2.1.1. Fungsi dan Mekanisme Kerja

Reaksi yang dikatalisis oleh SOD adalah sebagai berikut:



Proses ini sangat penting karena radikal superoksida adalah produk sampingan yang sangat reaktif dari metabolisme oksidatif. Jika tidak dinetralkan, radikal bebas atau stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan signifikan pada DNA, protein, dan membranosa yang pada gilirannya dapat memicu berbagai kondisi patologis. Terdapat tiga isoform utama SOD dalam sel eukariotik, masing-masing berlokasi di kompartemen seluler yang berbeda dan memiliki kofaktor logam yang berbeda:³³

1. SOD1 (Cu/Zn-SOD): *Isoform* ini berlokasi di sitosol, yaitu bagian cair dari sel yang berada di luar organel. SOD1

mengandung ion tembaga (Cu) dan seng (Zn) sebagai kofaktor.

Fungsi utama SOD1 adalah

untuk melindungi komponen-komponen seluler di dalam sitoplasma dari kerusakan oksidatif. SOD1 adalah bentuk yang paling banyak ditemukan dan berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan redoks di dalam sel.

2. SOD2 (Mn-SOD): *Isoform* ini ditemukan di mitokondria, organel yang bertanggung jawab untuk produksi energi melalui respirasi oksidatif. SOD2 mengandung ion mangan (Mn) sebagai kofaktor. Mengingat mitokondria adalah sumber utama produksi radikal bebas superoksida selama proses fosforilasi oksidatif, SOD2 memainkan peran kritis dalam melindungi mitokondria dan, secara lebih luas, sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh akumulasi radikal superoksida.
3. SOD3 (EC-SOD): *Isoform* ini berlokasi di ruang ekstraseluler, yaitu bagian luar sel yang berisi cairan ekstraseluler dan matriks ekstraseluler. SOD3 juga mengandung ion tembaga dan seng sebagai kofaktor. Fungsi utama SOD3 adalah untuk melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas yang ada di ruang ekstraseluler. SOD3 penting dalam menjaga kesehatan jaringan dan mencegah peradangan serta kerusakan yang diakibatkan oleh stres oksidatif di luar sel.³⁴

2.1.2. Peningkatan Kadar SOD

2.1.2.1. Suplemen Antioksidan

Penelitian menunjukkan bahwa suplemen antioksidan seperti vitamin C dan E dapat membantu meningkatkan aktivitas SOD dalam tubuh. Vitamin C, yang dikenal sebagai asam askorbat, berperan sebagai donor elektron yang membantu mengurangi radikal bebas dan mendukung regenerasi SOD. Vitamin E, yang dikenal sebagai *tokoferol*, berfungsi sebagai antioksidan lipid yang melindungi membran sel dari peroksidasi lipid. Suplementasi dengan kedua vitamin ini dapat meningkatkan kapasitas antioksidan tubuh secara keseluruhan dan memperkuat mekanisme pertahanan enzimatik SOD. Mineral seperti selenium, tembaga, seng, dan mangan, yang merupakan kofaktor penting bagi aktivitas SOD, juga dapat diberikan sebagai suplemen untuk meningkatkan efisiensi enzim ini.³²

2.1.2.2. Aktivitas Fisik

Olahraga teratur telah terbukti meningkatkan kadar SOD dalam tubuh. Latihan fisik meningkatkan produksi radikal bebas melalui peningkatan konsumsi oksigen, yang pada gilirannya merangsang peningkatan ekspresi enzim antioksidan termasuk SOD. Penelitian menunjukkan bahwa individu yang melakukan aktivitas fisik secara rutin

memiliki tingkat aktivitas SOD yang lebih tinggi dibandingkan dengan mereka yang tidak aktif.³⁵

2.1.2.3. Terapi Gen

Penelitian praklinis menggunakan model hewan telah menunjukkan bahwa terapi gen yang menargetkan gen SOD1, SOD2, atau SOD3 dapat meningkatkan kadar dan aktivitas SOD, serta mengurangi kerusakan oksidatif dan memperbaiki fungsi seluler. Sebagai contoh, terapi gen yang meningkatkan ekspresi SOD2 telah menunjukkan potensi dalam melindungi neuron dari kerusakan oksidatif pada model hewan penyakit neurodegeneratif.³⁶

2.1.3. Pengukuran SOD

Pengukuran kadar SOD dalam penelitian dan klinis dapat dilakukan melalui berbagai metode, di antaranya:

2.1.3.1. Metode Spektrofotometri

Metode spektrofotometri adalah salah satu cara yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas SOD. Prinsip dasar metode ini adalah mengukur penurunan absorbansi pada panjang gelombang tertentu yang terkait dengan reaksi enzimatis SOD. Biasanya, metode ini melibatkan penggunaan substrat spesifik yang akan diubah oleh SOD menjadi produk yang dapat diukur. Salah satu reaksi yang sering digunakan adalah dismutasi radikal

superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, di mana penurunan absorbansi *nitroblue tetrazolium* (NBT) pada panjang gelombang sekitar 560 nm sering digunakan untuk menentukan aktivitas SOD. Penurunan absorbansi menunjukkan seberapa banyak radikal superoksida yang telah didismutasi oleh SOD, yang kemudian dapat digunakan untuk menghitung aktivitas enzim tersebut.³²

2.1.3.2. Metode Elektrokimia

Metode elektrokimia menggunakan elektroda selektif untuk mendeteksi produk reaksi SOD. Teknik ini melibatkan pengukuran perubahan arus listrik yang dihasilkan oleh reaksi elektrokimia yang terjadi ketika radikal superoksida dikatalisis oleh SOD. Elektroda yang digunakan biasanya dilapisi dengan bahan yang dapat bereaksi dengan radikal superoksida atau produk reaksi seperti hidrogen peroksida. Keunggulan metode elektrokimia adalah sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, memungkinkan deteksi kadar SOD dalam sampel dengan konsentrasi rendah. Teknik ini dapat memberikan hasil yang cepat dan memungkinkan pengukuran berulang dalam waktu singkat.³⁷

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

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah metode yang menggunakan antibodi spesifik untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi SOD. Metode ini melibatkan penangkapan SOD dalam sampel menggunakan antibodi yang terikat pada permukaan mikrotiter. Setelah penangkapan, antibodi kedua yang terkonjugasi dengan enzim ditambahkan untuk membentuk kompleks dengan SOD. Substrat enzim kemudian ditambahkan, menghasilkan reaksi warna yang dapat diukur secara spektrofotometri. Intensitas warna yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi SOD dalam sampel. ELISA menawarkan sensitivitas yang tinggi dan spesifisitas untuk isoform SOD tertentu, menjadikannya alat yang berharga dalam penelitian klinis dan laboratorium untuk mengukur kadar SOD dalam berbagai jenis sampel biologi seperti serum, plasma, dan jaringan.³⁸

2.2. *Interleukin-10 (IL-10)*

IL-10 memiliki efek antiinflamasi dan immunosupresif, dan karenanya memainkan peran kunci dalam menurunkan respons imun dan mencegah peradangan berlebihan. Fungsi monosit dan makrofag khususnya sangat dipengaruhi oleh IL-10. IL-10 meningkatkan pelepasan mediator antiinflamasi oleh sel-sel ini dan menghambat kemampuan mereka untuk

menghasilkan molekul proinflamasi. IL-10 menghambat kemampuan penyajian antigen monosit, makrofag, dan sel dendritik, dan meningkatkan fungsi pemicu toleransi, pemulung, dan fagositosisnya. IL-10 juga dapat menekan respons imun yang dimediasi Th1 dengan menghambat proliferasi sel T CD4 + dan kemampuannya untuk menghasilkan sitokin proinflamasi.²⁴

Pada tingkat seluler IL-10 berperan sebagai agen pengatur *Postranskriptional* untuk menekan *messenger RNA* (mRNA) untuk menstabilkan protein HuR (*Human antigen R*), selain itu IL-10 mampu menghambat pensinyalan *apoptosis* melalui jalur p38. Hasil penelitian lainya menunjukan bahwa kadar IL-10 dapat ditingkatkan dengan pemberian ekstrak pegagan 500mg/kgBB/hari pada tikus sampel hiperkolestrolemia dibandingkan pemberian obat simvastatin 1,8mg/KgBB/hari.^{24,25,40}

2.3. Tumbuhan Pegagan

2.3.1. Definisi Daun Pegagan (*Centella Asiatica*)

Pegagan merupakan tanaman obat, bentuk daunnya bulat seperti ginjal manusia, batangnya lunak dan beruas, serta menjalar hingga mencapai satu meter. Pegagan mudah didapat dan banyak ditemukan di daerah perkebunan, ladang, tepi jalan, pematangan sawah, ataupun di ladang yang agak basah . Pegagan berasal dari Asia tropik, menyukai tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung serta dapat ditemukan didaerah dataran rendah

sampai dengan dataran ketinggian 2500 meter dpl. Tanaman pegagan dapat tumbuh baik dengan intensitas cahaya 30–40%, sehingga dapat dikembangkan sebagai tanaman sela musiman.²⁵

Penelitian menunjukkan bahwa daun pegagan mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti *triterpenoid*, *flavonoid*, *tanin*, *saponin*. Senyawa- senyawa ini diketahui juga dapat merangsang produksi kolagen, mempercepat proses epitelisasi, dan meningkatkan kekuatan tarik jaringan parut. Kolagen adalah protein utama dalam kulit yang memberikan kekuatan dan struktur, sehingga peningkatan produksi kolagen dapat mempercepat penyembuhan luka dan meningkatkan kualitas jaringan baru yang terbentuk. Penelitian juga menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan dapat mengurangi peradangan dan oksidasi, dua faktor yang dapat menghambat proses penyembuhan luka.⁴¹

Daun pegagan (*Centella Asiatica*) telah diteliti karena kemampuannya dalam mengurangi gejala gangguan kecemasan dan depresi. Efek ini sebagian besar dikaitkan dengan peningkatan sirkulasi darah ke otak dan pengurangan tingkat hormon stres. Penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan fungsi kognitif dan memori, menjadikannya potensial dalam pengobatan kondisi *neurodegeneratif* seperti *Alzheimer*.⁴²

Dalam konteks penyembuhan luka, penelitian yang dilakukan pada model hewan dan uji klinis manusia telah menunjukkan bahwa

penggunaan topikal atau oral dapat mempercepat penyembuhan berbagai jenis luka, termasuk luka bakar, luka bedah, dan luka kronis seperti ulkus diabetik. Misalnya, sebuah studi yang diterbitkan dalam *Journal of Wound Care* menunjukkan bahwa krim yang mengandung ekstrak *Centella Asiatica* secara signifikan meningkatkan penyembuhan luka pada pasien dengan luka kronis dibandingkan dengan plasebo.⁴⁴

Potensi antioksidan juga memberikan manfaat tambahan dalam melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Kerusakan oksidatif ini sering dikaitkan dengan penuaan dini dan berbagai penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung. Penelitian juga menunjukkan bahwa antioksidan yang terdapat dalam daun pegagan (*Centella Asiatica*) dapat membantu dalam regenerasi kulit dan memperbaiki kerusakan kulit akibat paparan sinar UV, yang merupakan faktor utama dalam penuaan kulit dan perkembangan kanker kulit.^{43,48}

Daun pegagan (*Centella Asiatica*) adalah tanaman yang termasuk dalam keluarga Apiaceae. Berikut adalah klasifikasi lengkapnya.^{32,44}

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom : *Tracheobionta* (tanaman vaskular)

Superdivisi : *Spermatophyta* (menghasilkan biji)

Divisi : *Magnoliophyta* (tumbuhan berbunga)

Kelas : *Magnoliopsida* (dikotil)
 Subkelas : *Rosidae*
 Ordo : *Apiales*
 Famili : *Apiaceae* (keluarga peterseli)
 Genus : *Centella*
 Spesies : *Centella Asiatica*



Gambar 2.1. Daun Pegagan (*Centella Asiatica*)

2.3.2. Kandungan Bahan Aktif Daun Pegagan (*Centella Asiatica*)

Daun pegagan (*Centella Asiatica*) mengandung berbagai senyawa kimia yang memberikan efek terapeutik bagi kesehatan. *Triterpenoid* merupakan komponen aktif utama dalam Daun Pegagan dan diketahui memiliki manfaat dalam penyembuhan luka serta efek antiinflamasi. *Asiaticoside*, salah satu *triterpenoid* terpenting, dikenal karena kemampuannya mengurangi peradangan dan merangsang produksi kolagen.⁴⁵

Kelompok senyawa lain yang terdapat dalam Daun Pegagan adalah *saponin*. *Saponin* memberikan sifat seperti sabun pada tanaman dan berkontribusi pada sifat antiinflamasi serta antioksidan. *Saponin* ini membantu mengurangi peradangan dan melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan.³⁴ *Flavonoid* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan berperan penting dalam melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif. Misalnya, *quercetin* memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker, sementara *kaempferol* mendukung kesehatan kardiovaskular.^{47,46}

Asam amino seperti *alanine*, *serine*, dan *valine* juga merupakan komponen penting dalam Daun Pegagan. Senyawa ini berperan dalam biosintesis protein dan metabolisme sel, mendukung kesehatan dan regenerasi sel yang penting untuk fungsi normal tubuh. Mineral seperti magnesium, kalsium, natrium, dan potassium dalam Daun Pegagan mendukung fungsi normal sel-sel tubuh dan keseimbangan elektrolit, yang sangat penting bagi kesehatan secara keseluruhan.^{47,46}

2.4. Air Alkali

Air alkali adalah air yang memiliki tingkat pH yang lebih tinggi dari air biasa yang memiliki pH netral sekitar 7,0, pH air alkali umumnya berada di atas 7,0, seringkali mencapai kisaran 8 hingga 9 atau bahkan lebih tinggi. Istilah "alkali" dalam konteks ini merujuk pada sifat dasar atau basa dari air

tersebut, yang berarti air tersebut cenderung memiliki kandungan mineral seperti kalsium, magnesium, kalium, dan bikarbonat.²⁶

Air Alkali tereduksi merupakan air yang sudah diolah melalui elektrolisis yang dapat meningkatkan potensial reduksi dalam tubuh dimana hal ini menjanjikan dalam menyediakan sumber electron bebas yang aman untuk memblokir oksidasi jaringan normal oleh radikal bebas yaitu oksigen bebas. Penelitian lainya juga mengungkapkan bahwa molekul hidrogen (H₂) menunjukan efek terapeutik dengan bertindak sebagai antioksidan terbaru.⁴⁹

Penelitian lain menyoroti potensi efek antioksidan dan detoksifikasi dari air alkali, air alkali dapat memiliki efek antioksidan dengan mengurangi radikal bebas dalam tubuh. Studi ini menemukan bahwa konsumsi air alkali meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, yang membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Efek ini berpotensi membantu dalam pencegahan penyakit kronis yang terkait dengan stres oksidatif.⁴³

Penelitian ini menemukan bahwa konsumsi air alkali-reduksi (ARW) dengan pH 9,5 pada dosis 10 mL/kg berat badan efektif dalam mengurangi stres oksidatif dan kelelahan yang diakibatkan oleh olahraga intens pada pria muda yang sehat. Setelah latihan, kelompok yang mengonsumsi ARW menunjukkan penurunan signifikan pada tingkat *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitric Oxide* (NO), dibandingkan dengan kelompok yang mengonsumsi air murni (PW), mengindikasikan bahwa ARW lebih efektif dalam mengurangi stres oksidatif. Konsumsi ARW juga meningkatkan kadar *Glutathione Peroxidase* (GPx) dan menurunkan kadar

Malondialdehyde (MDA). Penanda kelelahan seperti laktat, laktat dehidrogenase, dan fosfat juga berkurang secara signifikan pada kedua kelompok, namun penurunan ini lebih jelas terlihat pada kelompok yang mengonsumsi ARW. Analisis korelasi menunjukkan bahwa ARW dapat membantu menjaga kondisi homeostatis untuk ROS, sistem antioksidan, dan penanda kelelahan. Temuan ini menunjukkan bahwa ARW efektif dalam mengurangi stres oksidatif dan kelelahan setelah olahraga intensif, serta dapat digunakan sebagai suplemen antioksidan pasca olahraga.²⁶

2.4.1. Kandungan Kimia Air Alkali

Zat kimia yang terdapat dalam air alkali dapat bervariasi tergantung pada sumber air dan proses pembuatannya. Secara umum, air alkali dapat mengandung beberapa zat kimia berikut:⁵⁰

2.4.1.1. *Ion Hidroksida* (OH⁻) : Ini adalah ion utama yang menyebabkan air memiliki sifat basa atau alkalis. Konsentrasi ion hidroksida yang tinggi dapat meningkatkan pH air menjadi lebih dari 7.

2.4.1.2. *Mineral dan Elektrolit* : Air alkali yang alami atau yang diberi tambahan mineral dapat mengandung berbagai mineral seperti kalsium, magnesium, potasium, dan sodium. Kandungan mineral ini dapat bervariasi tergantung pada sumber air dan proses pemurnian yang digunakan.

2.4.1.3. *Senyawa Elektrolit* : Selain mineral, air alkali juga dapat mengandung senyawa elektrolit lain seperti karbonat,

bikarbonat, dan sulfat. Senyawa-senyawa ini berkontribusi pada sifat kimia air alkali dan dapat mempengaruhi pH serta keseimbangan elektrolit tubuh saat dikonsumsi.

2.4.1.4. Bahan Tambahan : Dalam beberapa kasus, air alkali dapat diperoleh melalui proses elektrolisis atau penambahan bahan kimia tertentu untuk meningkatkan pH-nya. Proses ini dapat mempengaruhi jenis zat kimia tambahan yang terdapat dalam air alkali.⁵⁰

2.5. Ultraviolet B

Radiasi ultraviolet B (UVB) adalah bagian dari spektrum sinar ultraviolet yang memiliki panjang gelombang antara 280 hingga 315 nanometer. UVB memiliki manfaat, terutama dalam proses sintesis vitamin D di kulit. Ketika kulit terpapar UVB, *7-dehydrocholesterol* diubah menjadi previtamin D₃, yang kemudian mengalami isomerisasi menjadi vitamin D₃ aktif. Vitamin D ini penting untuk kesehatan tulang dan sistem imun. Namun, keseimbangan antara manfaat dan risiko dari paparan UVB sangat bergantung pada durasi dan intensitas paparan serta jenis kulit individu.⁵²

UVB dikenal sebagai salah satu komponen sinar matahari yang paling berbahaya bagi kulit manusia, meskipun hanya sebagian kecil dari radiasi UVB yang mencapai permukaan bumi. Paparan UVB dapat menyebabkan berbagai efek biologis pada kulit, seperti eritema (kondisi kemerahan pada kulit akibat peradangan), penuaan dini, dan peningkatan risiko kanker kulit, terutama karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa. Radiasi

ultraviolet B (UVB) memiliki potensi tinggi untuk merusak kulit. Paparan UVB dapat memicu serangkaian reaksi biokimia yang menyebabkan kerusakan seluler, terutama melalui dua mekanisme utama: kerusakan DNA dan pembentukan spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* atau ROS).^{51,54}

UVB dapat langsung menyebabkan kerusakan DNA dengan menginduksi pembentukan dimer pirimidin, khususnya *dimer siklobutan pirimidin* (CPDs) dan produk 6-4 fotoadduk. Dimer ini menyebabkan distorsi pada struktur heliks ganda DNA, yang dapat mengganggu replikasi dan transkripsi DNA. Jika kerusakan ini tidak diperbaiki, mutasi dapat terjadi, yang pada akhirnya dapat menyebabkan perkembangan kanker kulit. Protein p53, yang dikenal sebagai "penjaga genom," sering kali terlibat dalam respon seluler terhadap kerusakan DNA yang diinduksi oleh UVB. Aktivasi p53 dapat mengarahkan sel untuk melakukan perbaikan DNA atau, dalam kasus kerusakan yang sangat parah, memicu *apoptosis* untuk mencegah proliferasi sel yang rusak.⁵³ Selain kerusakan DNA, UVB juga dapat menyebabkan pembentukan ROS, seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil. Pembentukan ROS ini terjadi sebagai akibat dari eksitasi molekul oksigen oleh energi UVB. ROS adalah molekul yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan pada komponen seluler lainnya, termasuk lipid membran, protein, dan bahkan DNA. Peroksidasi lipid, misalnya, dapat merusak integritas membran sel, menyebabkan kebocoran seluler dan akhirnya kematian sel. Kerusakan

protein oleh ROS dapat mengganggu fungsi enzimatis dan sinyal seluler, sementara kerusakan DNA oleh ROS dapat berkontribusi lebih lanjut pada risiko mutasi dan karsinogenesis.^{55,56}

2.6. *Collagen loss*

2.6.1. *Mekanisme collagen loss*

Kolagen adalah protein struktural utama dalam jaringan ikat, kulit, tendon, tulang, dan kartilago yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada jaringan. Kolagen yang ditemukan pada kulit adalah kolagen jenis I, III, V, dan VI yang terorganisir membentuk struktur horizontal di lapisan dermis, dan diantara struktur tersebut terdapat serat elastin. Kolagen tipe I adalah yang terbanyak jumlahnya dari jaringan ikat yang ada pada kulit. Kolagen tipe I diproduksi di sel fibroblast dengan dua proses, yaitu proses intrasel dan ekstrasel. Pada proses intrasel awalnya terbentuk prokolagen yang berupa 2 rantai peptida alfa pada proses translasi di ribosom sepanjang *Rough Endoplasmic Reticulum* (RER). Selanjutnya, rantai polipeptida dipindahkan ke bagian rantai pro-alpha, kemudian terjadi proses hidroksilasi lisin dan prolin dengan bantuan senyawa asam askorbat. Sisa hidroksisilin akan mengalami glikosilasi dan selanjutnya terbentuk triple alpha helik. Pada akhir proses intrasel, prokolagen dieksositosis ke badan Golgi.^{57,58}

Kepadatan kolagen dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan faktor lingkungan. Faktor yang termasuk dalam faktor intrinsik yaitu

faktor genetik dan hormon, sedangkan faktor ekstrinsik dipengaruhi oleh sinar ultraviolet, diet, dan polusi. Produksi kolagen juga sangat dipengaruhi oleh hormon. *Hormon setrogen* dapat meningkatkan pembentukan serat kolagen. Wanita yang dalam kondisi menopause dapat mengalami kondisi penurunan kepadatan kolagen secara signifikan. Kehilangan kolagen atau *collagen loss* dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti penuaan, paparan sinar ultraviolet (UVB), serta kondisi kesehatan tertentu. Seiring bertambahnya usia, produksi kolagen di tubuh manusia menurun secara signifikan akibat berkurangnya aktivitas fibroblas, yaitu sel yang bertanggung jawab untuk sintesis kolagen. Penurunan produksi kolagen ini juga diikuti oleh peningkatan aktivitas enzim yang memecah kolagen, seperti *matrix metalloproteinase* (MMPs). MMP-1 (*kolagenase*) berperan dalam degradasi kolagen tipe I dan III, yang merupakan jenis kolagen utama pada kulit. Disfungsi atau defisiensi pada salah satu tahapan proses ini dapat mengakibatkan gangguan produksi kolagen, yang berkontribusi pada berbagai kondisi medis seperti penyakit jaringan ikat, dan penuaan kulit.^{58,59}

2.7. Gambaran Histologi Kulit

Kulit adalah organ terbesar dalam tubuh manusia dan memiliki struktur yang kompleks, terdiri dari tiga lapisan utama: epidermis, dermis, dan hipodermis. Masing-masing lapisan memiliki fungsi dan karakteristik histologis yang berbeda.

2.7.1. Epidermis

Epidermis adalah lapisan paling luar kulit, terdiri dari lapisan sel epitel skuamosa berlapis (*stratified squamous epithelium*) yang sebagian besar merupakan keratinosit. Epidermis, lapisan paling luar dari kulit, terdiri dari beberapa sublapisan yang memiliki fungsi spesifik. Lapisan terdalam adalah Stratum Basale, yang terdiri dari sel-sel basal berbentuk kuboid atau kolumnar. Sel-sel ini terus-menerus membelah, menghasilkan keratinosit baru yang merupakan sel-sel utama di epidermis. Di atasnya, terdapat Stratum Spinosum, yang terdiri dari beberapa lapisan keratinosit yang terhubung oleh desmosom. Struktur desmosom ini memberikan tampilan "spinosus" atau berduri pada lapisan ini di bawah mikroskop.⁶²

Selanjutnya, Stratum Granulosum terdiri dari beberapa lapisan keratinosit yang mulai mengalami keratinisasi, ditandai dengan adanya butiran keratohialin dalam sitoplasma sel. Stratum Lucidum, lapisan tipis yang hanya ditemukan pada kulit tebal seperti telapak tangan dan kaki, terdiri dari sel-sel mati yang transparan. Lapisan paling luar adalah Stratum Corneum, yang terdiri dari beberapa lapisan sel mati (keratinocytes) yang telah terkeratinisasi, memberikan perlindungan fisik dari lingkungan luar. Struktur berlapis-lapis ini memberikan perlindungan efektif bagi tubuh dari ancaman eksternal.⁶⁰

2.7.2. Dermis

Dermis terletak di bawah epidermis dan terdiri dari jaringan ikat yang kaya akan serat kolagen dan elastin, memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit. Dermis juga mengandung pembuluh darah, saraf, dan struktur tambahan lainnya seperti folikel rambut, kelenjar sebaceous (minyak), dan kelenjar keringat. Dermis, lapisan kulit yang terletak di bawah epidermis, terdiri dari dua sublapisan utama yang memainkan peran penting dalam fungsi dan struktur kulit. *Papillary Dermis* adalah lapisan tipis yang berada tepat di bawah epidermis, terdiri dari jaringan ikat longgar yang kaya akan kapiler darah dan ujung saraf sensorik. Papillae dermis, yang merupakan tonjolan kecil di lapisan ini, berperan penting dalam meningkatkan luas permukaan kontak antara dermis dan epidermis. Ini memungkinkan pertukaran nutrisi, oksigen, dan limbah yang lebih efisien antara kedua lapisan, serta mendukung fungsi sensorik yang memungkinkan kulit merasakan sentuhan, tekanan, dan suhu. *Papillary dermis* berperan dalam membentuk sidik jari, pola unik yang ditemukan di telapak tangan dan kaki.⁶⁰

Di bawah *papillary dermis*, terdapat Reticular Dermis, yang merupakan lapisan lebih tebal dari dermis dan terdiri dari jaringan ikat padat. Jaringan ini kaya akan serat kolagen yang tersusun dengan baik, memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit. Serat-serat kolagen ini juga mendukung berbagai struktur penting dalam

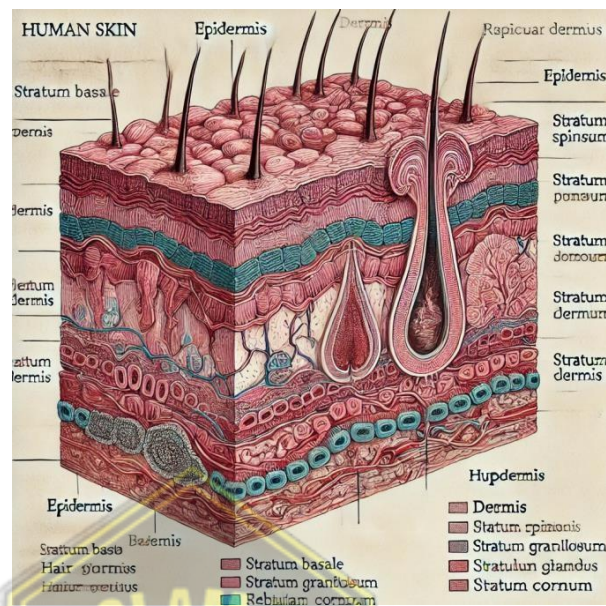
kulit, seperti folikel rambut, kelenjar sebaceous (minyak), dan kelenjar keringat. Elastin, protein lain yang ditemukan dalam reticular dermis, memberikan kulit kemampuan untuk kembali ke bentuk asalnya setelah ditarik atau diregangkan. Lapisan ini mengandung pembuluh darah yang lebih besar, serta jaringan limfatik yang membantu dalam proses penyembuhan luka dan respon imun. Kombinasi dari papillary dan reticular dermis ini memberikan dermis kemampuan untuk melindungi tubuh dari cedera mekanis, menjaga elastisitas kulit, serta mendukung epidermis dalam fungsi nutrisi dan sensorik. Keduanya bekerja sama untuk memastikan kulit dapat menahan tekanan eksternal, tetap terhidrasi, dan merespon berbagai rangsangan dari lingkungan sekitar.⁶¹

2.7.3. Hipodermis (Subkutis)

Hipodermis adalah lapisan terdalam kulit yang terdiri dari jaringan adiposa (lemak) dan jaringan ikat longgar. Lapisan ini berfungsi sebagai penyimpan energi, insulasi panas, dan bantalan untuk melindungi organ- organ dalam dari cedera mekanis. Hipodermis juga mengandung pembuluh darah besar dan saraf yang memelihara kulit. Hipodermis merupakan lapisan terdalam dari kulit yang memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan tubuh serta melindungi organ-organ dalam. Lapisan ini terutama terdiri dari jaringan adiposa (lemak), yang berfungsi sebagai cadangan energi bagi tubuh. Lemak yang disimpan dalam hipodermis dapat

dipecah menjadi asam lemak dan gliserol ketika tubuh memerlukan energi, seperti saat terjadi defisit kalori. Ini menjadikan hipodermis sebagai bank energi yang penting, yang dapat membantu tubuh bertahan dalam kondisi kekurangan makanan.⁶⁴

Selain jaringan adiposa, hipodermis juga mengandung jaringan ikat longgar yang mengikat kulit dengan struktur yang lebih dalam seperti otot dan tulang. Jaringan ikat ini memungkinkan kulit memiliki mobilitas yang cukup untuk mengikuti gerakan tubuh tanpa mudah robek atau rusak. Lapisan hipodermis juga kaya akan pembuluh darah besar dan saraf. Pembuluh darah di lapisan ini berfungsi untuk mendistribusikan nutrisi dan oksigen ke kulit serta mengangkut limbah metabolisme dari jaringan kulit untuk dieliminasi. Sementara itu, serabut saraf yang terdapat di hipodermis memberikan sensasi seperti tekanan dalam dan nyeri. Saraf ini juga berperan dalam mengirimkan sinyal ke otak untuk merespons berbagai rangsangan eksternal, termasuk perubahan suhu dan tekanan.⁶³



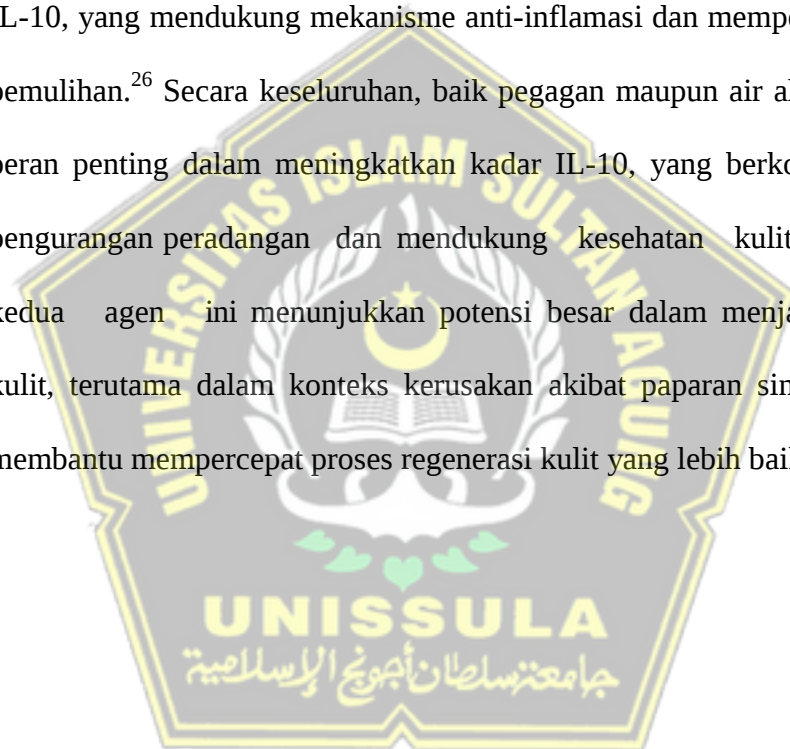
Gambar 2.2. Gambaran Histologi Kulit

2.8. Pengaruh Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap kadar IL-10 dan SOD pada *Collagen loss*

Senyawa metabolit aktif daun pegagan, seperti *flavonoid*, *tannin*, *saponin* dan *triterpenoid*, berkontribusi pada peningkatan produksi *interleukin-10* (IL-10), yaitu sitokin anti-inflamasi yang penting dalam mengatur respon imun dan peradangan. Penelitian menunjukkan bahwa pegagan dapat merangsang aktivitas sel-sel imun, yang pada gilirannya meningkatkan kadar IL- 10 dalam tubuh. Peningkatan kadar IL-10 dapat menekan peradangan pada jaringan akibat paparan sinar UVB, membantu mempercepat proses regenerasi dan penyembuhan kulit.⁶⁶ Penelitian Chee Kong Yap *et al.* (2021) melaporkan peningkatan aktivitas enzim antioksidan pada *Centella Asiatica* saat terpapar Cu dan Pb dapat digunakan sebagai indikator bahwa *Centella Asiatica* dapat menghambat stres oksidatif. Peningkatan kadar SOD ini penting karena SOD berfungsi melindungi sel

dari kerusakan oksidatif dengan mengubah superoksida, radikal bebas yang berbahaya, menjadi hidrogen peroksida yang kurang berbahaya. Dengan demikian, pegagan berkontribusi secara signifikan dalam meningkatkan kadar SOD, yang membantu melindungi kulit dari kerusakan akibat radikal bebas dan mendukung kesehatan kulit secara keseluruhan.²⁶

Konsumsi air alkali yang memiliki pH basa dapat meningkatkan kadar IL-10, yang mendukung mekanisme anti-inflamasi dan mempercepat proses pemulihan.²⁶ Secara keseluruhan, baik pegagan maupun air alkali memiliki peran penting dalam meningkatkan kadar IL-10, yang berkontribusi pada pengurangan peradangan dan mendukung kesehatan kulit. Kombinasi kedua agen ini menunjukkan potensi besar dalam menjaga kesehatan kulit, terutama dalam konteks kerusakan akibat paparan sinar UVB, dan membantu mempercepat proses regenerasi kulit yang lebih baik.^{26,66}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

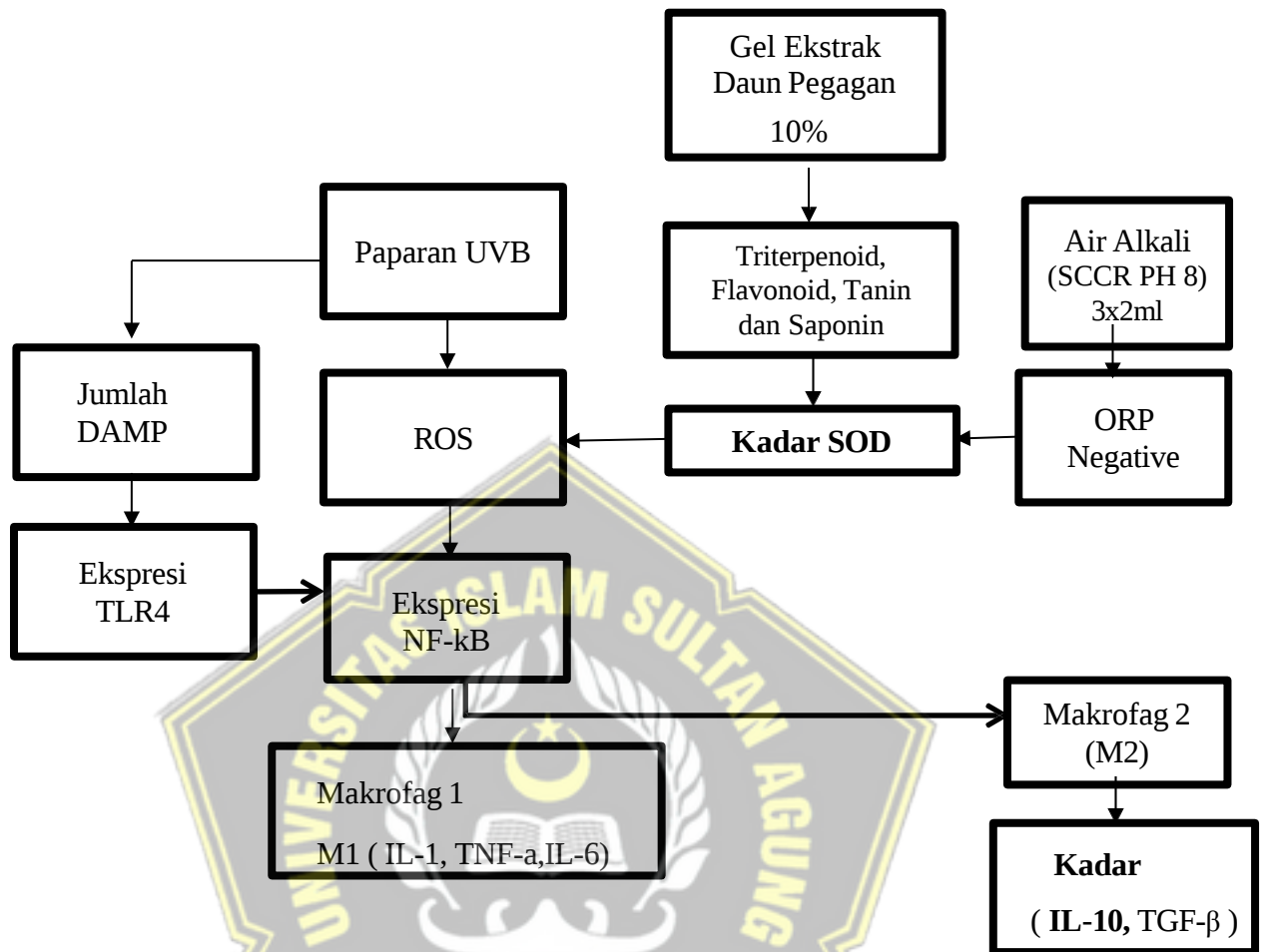
3.1. Kerangka Teori

Sinar ultraviolet B atau yang sering disebut UVB merupakan salah satu gelombang yang dihantarkan oleh paparan sinar matahari, sinar UVB dengan 280- 315 nm dengan paparan waktu tertentu dapat meningkatkan respon peradangan. Paparan UVB membuat sel dalam tubuh stres dan merespon dengan ekspresi P53, P53 yang muncul mengakibatkan sel mengalami *apoptosis*, akibat terjadinya *apoptosis* sel mengalami kerusakan yang disebut *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) yang akan mengaktifkan TLR4 sebagai proinflamatori menyalurkan sinyal melalui NF-K β . NF-K β juga distimulasi oleh Agen ROS yang muncul karena paparan UVB. NF-K β menstimulasi munculnya *makrofag 1* (M1) yang selanjutnya akan memunculkan TNF-a, Interleukin 6, dan Interleukin 1 dimana ekspresi ini merupakan agen dari Pro Inflamasi.³⁹ M1 juga menstimulasi munculnya ekspresi P38 (MAPK) adalah responsif terhadap rangsangan stres, seperti peradangan, kerusakan DNA, dan stres metabolik. Protein p38 berperan dalam respons seluler terhadap stres stimulus. P38 menstimulasi munculnya miR21 yang akan berperan dalam perusakan mRNA tumor supresor dapat menekan ekspresi gen tumor supresor PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog deleted*). Ketika PTEN ditekan maka aktivasi AKT meningkat sehingga menstimulasi munculnya Makrofag 2. Makrofag 2 ini yang akan menstimulasi munculnya *Interleukin 10*, dan *Tumor Growth Factor Beta*

(TGF- β).^{69,54}

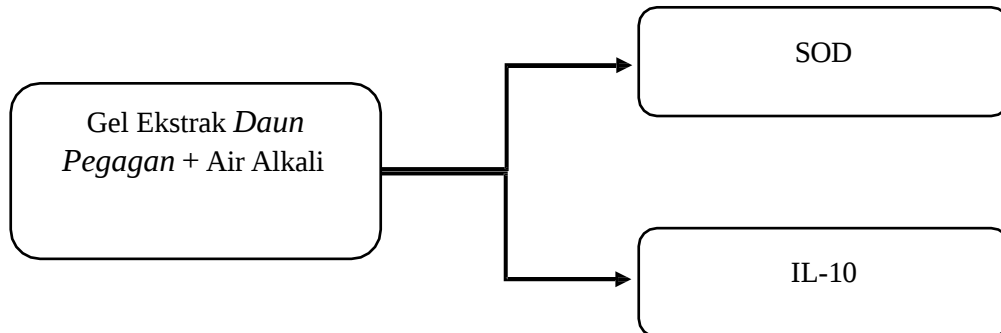
Dalam penelitian ini, daun pegagan diekstraksi dan diberikan dalam bentuk gel, ekstrak daun pegagan yang memiliki kandungan *flavonoid* sebagai antioksidan langsung bekerja dalam sel tepatnya matriks mitokondria dengan mengkatalis dismutase pada superoksida sehingga berubah menjadi *hydrogen peroxide*. Umumnya superoksida dioksidase atau SOD dihasilkan oleh sitoplasma (SOD 1), mitokondria (SOD 2), bagian akhir adalah diluar sel (SOD 3). Hasil penguraian SOD inilah yang akan mencegah terbentuknya ROS. Daun Pegagan ini menekan aktivitas makrofag 1 sebagai agen inflamasi dan menstimulasi produksi makrofag 2 sebagai anti inflamasi sehingga proses inflamasi dapat dicegah atau dihentikan.^{70,71,72}

Air alkali merupakan air dengan susunan alkali hydrogen dengan Ph 8~10 sehingga memiliki potensi terjadinya reduksi oksidasi atau ORP negatif yang mampu membersihkan ROS dan menekan aktivitas Makrofag 1 yang akan menghasilkan IL-1 dan IL-6. Air alkali juga menstimulasi munculnya makrofag 2 akan meningkatkan terbentuknya IL-10 sebagai anti inflamasi.^{26,49}



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

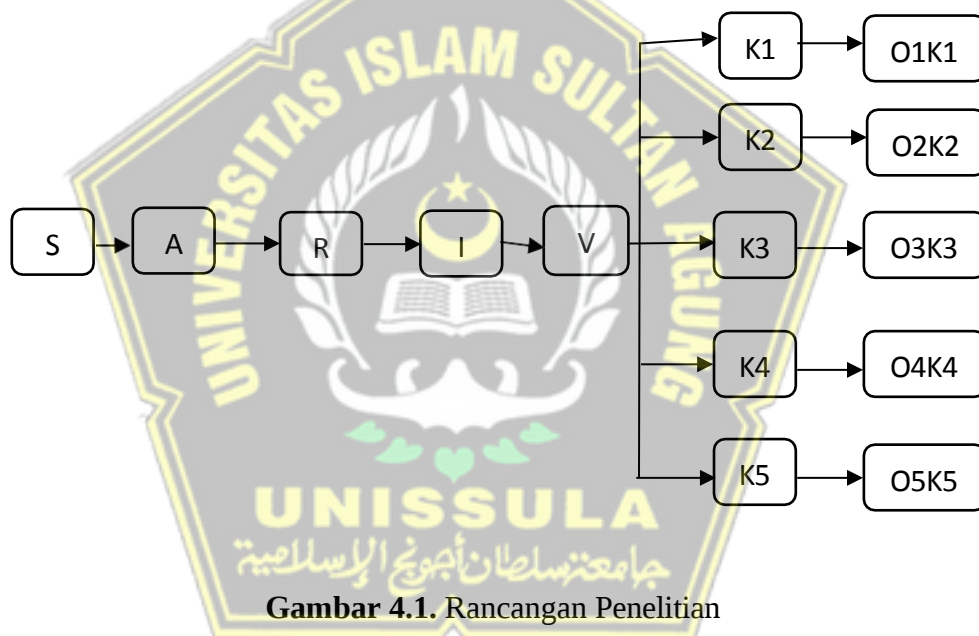
Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan (*Centella Asiatica*) dan air alkali per oral terhadap kadar SOD dan IL -10 Pada Tikus Wistar Model *Collagen Loss* Yang Dipapar UVB.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan *randomized post test only control group desain*. Dalam rancangan penelitian ini tikus akan dibagi menjadi 5 kelompok dengan skema sebagai berikut :



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel
- A : Aklimatisasi hewan uji coba
- R : Randomisasi hewan uji coba
- I : Induksi UVB
- V : Validasi
- K1 : Tikus dipapar UVB
- K2 : Tikus dipapar UVB dan diberi Hyaluronic Acid oles
- K3 : Tikus dipapar UVB dan diberi gel ekstrak Daun Pegagan 10% oles
- K4 : Tikus dipapar UVB dan diberi air alkali per oral 3 kali 2ml
- K5 : Tikus dipapar UVB dan diberi air alkali per oral 3 kali 2ml

- K5 : Tikus dipapar UVB dengan diberi gel ekstrak Daun Pegagan 10% dan kombinasi air alkali per oral 3 kali 2ml
- O1K1 : observasi SOD dan kadar IL-10 kelompok K1
- O2K2 : observasi SOD dan kadar IL-10 kelompok K2
- O3K3 : observasi SOD dan kadar IL-10 kelompok K3
- O4K4 : observasi SOD dan kadar IL-10 kelompok K4
- O5K5 : observasi SOD dan kadar IL-10 kelompok K5

4.2. Subjek dan Sampel Penelitian

4.2.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dipapar sinar UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *minimal erythema dose* (MED) 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu pada hari ke 1, 2, 4, 5, dan 7 selama 2 minggu hingga berkurangnya densitas kolagen.

4.2.2. Sampel Penelitian

Teknik pengambilan sample menggunakan *randomized sampling*. Tikus wistar Jantan sebanyak 30 ekor yang memenuhi kriteria inklusi dibagi ke dalam 5 kelompok secara acak sederhana.

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

- a) Usia 8-12 minggu
- b) Tikus kondisi sehat, aktif
- c) Berat badan 200 - 250 gr
- d) Secara makroskopis tikus tidak ada kelainan morfologi

e) Jenis kelamin jantan

4.2.2.2. Kriteria Ekslusi

Tikus yang sakit

4.2.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang mati selama proses penelitian

4.2.3. Besar Sampel

Adapun besar sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor. Dimana 30 ekor tikus putih tersebut dibagi dalam 5 kelompok uji, yang masing-masing kelompok uji terdiri dari 6 ekor tikus putih. Perhitungan besar sampel dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut:

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n = 4,75 = 5$$

Keterangan :

t : Jumlah kelompok uji

n : Besar sampel per kelompok

Besar sampel ideal menurut hitungan rumus Federer adalah 5 ekor tikus putih atau lebih. Untuk mengantisipasi resiko mortalitas pada tikus, setiap kelompok perlakuan ditambah sampel sebanyak satu ekor tikus. Dengan demikian jumlah tikus jantan semua kelompok uji secara keseluruhan adalah 30 ekor.

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Penelitian

Berikut adalah penjelasan mengenai variabel-variabel yang terlibat:

1. Variabel Bebas (Independent Variables)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Pemberian Gel Ekstrak *Daun Pegagan* dan Air Alkali

2. Variabel Tergantung (Dependent Variables)

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah kadar SOD dan IL-10

3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah paparan sinar UVB

4. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus wistar jantan, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi, lingkungan tempat tikus dipelihara.

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Ekstrak *Daun Pegagan*

Daun pegagan dalam penelitian ini berasal dari RSUP. Dr. Sarjito di Tawangmangu yang berumur 3 bulan dengan kondisi panen daun berwarna hijau tanpa adanya bintil atau jamur. Pembuatan Ekstrak daun pegagan dimulai dari

mengeringkan daun pegagan yang dimaserasi selama 72 jam dan di evaporasi dengan rotary vacuum evaporator. Pemberian gel yang mengandung ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 10 % yang dioleskan pada kulit tikus, 100 mg 1x sehari selama 14 hari.

Pada penelitian ini kadar ekstrak daun pegagan ditetapkan dalam skala Ordinal.

4.3.2.2. Air Alkali

Air alkali yang digunakan berasal dari Lab SCCR dengan pH 8. Dosis pemberian air alkali secara oral adalah 3x2ml/hari, Skala Ordinal.

4.3.2.3. Kadar SOD

Kadar SOD mengacu pada konsentrasi atau tingkat aktivitas enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dalam suatu sampel jaringan. SOD adalah enzim yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif dengan mengkatalisis dismutasi radikal superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Diukur dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Kadar SOD dinyatakan dalam unit spesifik unit per mililiter.

4.3.2.4. Kadar IL-10

Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin anti-inflamasi yang diproduksi oleh berbagai jenis sel imun, termasuk sel

T-helper 2 (Th2), monosit, makrofag, dan sel B. Dalam penelitian, IL-10 dapat diukur dan dianalisis untuk mengevaluasi respon imun dan inflamasi dalam berbagai kondisi klinis dan eksperimental IL-10. Pengambilan sampel melalui jaringan kulit dan menggunakan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), yang memberikan data kuantitatif mengenai konsentrasi IL-10 dalam sampel dengan satuan Pikogram per Mililiter (pg/mL), Skala Rasio.

4.3.2.5. Paparan sinar UVB

Paparan radiasi sinar UVB adalah jumlah intensitas sinar UVB yang dihasilkan oleh perangkat UVB narrowband tipe TL – F72 – 100W/12 yang dipaparkan sebanyak 5 kali peminggu selama 2 minggu. Dosis paparan sinar UVB 160 mj/cm² dan setiap pemaparan diberikan selama 8 menit dengan jarak 20cm.

4.4. Peralatan Penelitian

4.4.1. Peralatan Ekstraksi

- a) Blender atau *Food Processor*: Untuk menghancurkan daun Daun Pegagan menjadi bubur halus.
- b) Saringan atau Kain Muslin: Untuk memisahkan cairan ekstrak dari ampas daun.
- c) Beaker Gelas: Untuk menampung ekstrak cair yang diperoleh.

- d) *Hot Plate* dengan *Magnetic Stirrer*: Untuk pemanasan dan pencampuran ekstrak dengan pelarut.
- e) *Rotary Evaporator*: Untuk menghilangkan pelarut dan mengkonsentrasikan ekstrak

4.4.2. Peralatan untuk Pembuatan Gel

- a) Beaker Berbagai Ukuran: Untuk menimbang dan mencampur bahan- bahan gel.
- b) *Hot Plate* dengan *Magnetic Stirrer*: Untuk pemanasan dan pencampuran bahan-bahan gel.
- c) Termometer: Untuk mengukur suhu campuran selama proses pemanasan.
- d) Timbangan Digital: Untuk menimbang bahan dengan presisi.
- e) Spatula: Untuk mengaduk dan mengeluarkan gel dari beaker.
- f) Pipet atau Syringe: Untuk mengukur dan menambahkan bahan cair dengan tepat.
- g) pH Meter: Untuk mengukur dan menyesuaikan pH gel.
- h) *Sterile Containers* atau Wadah Steril: Untuk menyimpan gel yang sudah jadi

4.4.3. Peralatan untuk Pemeliharaan Tikus

- a) Kandang Tikus: Kandang standar untuk pemeliharaan tikus dengan ventilasi yang baik.
- b) Termohigrometer: Untuk mengukur dan memantau suhu serta

kelembapan dalam kandang.

- c) Timbangan Elektronik: Untuk mengukur berat badan tikus secara berkala.

4.4.4. Peralatan Pendukung

- a) *Vortex Mixer*: Untuk mencampur reagen dengan cepat dan homogen.
- b) pH Meter: Untuk mengukur pH air alkali.
- c) *Incubator*: Untuk inkubasi sampel pada suhu tertentu.
- d) *Refrigerator/Freezer*: Untuk penyimpanan reagen dan sampel.
- e) Pipet dan Tips: Untuk pengukuran volume cairan yang presisi.
- f) *Sterilizer/Autoclave*: Untuk mensterilkan alat-alat yang digunakan dalam penelitian
- g) Perangkat UVB narrowband tipe TLF72-100w/12.
- h) Mikroskop staining jar
- i) Laptop

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. *Ethical clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan kepada komite bioetik fakultas kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Terlampir.

4.5.2. Prosedur Pembuatan Ekstrak

Daun pegagan dikumpulkan, lalu dibersihkan dan dikeringkan di tempat yang teduh dan berventilasi baik atau menggunakan oven

pengering pada suhu rendah (sekitar 40-50°C) hingga kering sempurna.

Daun yang sudah kering digiling menggunakan blender atau food processor hingga menjadi serbuk halus. Serbuk hasil penggilingan kemudian disaring menggunakan saringan halus untuk mendapatkan partikel serbuk yang konsisten dalam ukuran dan tekstur.

Untuk ekstraksi, serbuk daun Daun Pegagan ditempatkan dalam beaker atau wadah kaca, lalu diberi pelarut seperti etanol 70% atau air distilasi dengan perbandingan yang tepat (misalnya, 1 gram serbuk dengan 10 ml pelarut). Campuran ini diaduk menggunakan magnetic stirrer selama 24-48 jam pada suhu kamar atau menggunakan ultrasonic bath untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi.

Campuran ekstraksi kemudian disaring, proses penyaringan dapat diulang jika diperlukan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih jernih.

Selanjutnya, pelarut dievaporasi menggunakan rotary evaporator pada suhu rendah (sekitar 40-50°C) hingga volume ekstrak berkurang dan mengental, atau dibiarkan menguap secara alami dengan ventilasi baik.

Pengeringan Ekstrak cair yang sudah pekat kemudian dikeringkan lebih lanjut menggunakan oven pengering pada suhu

rendah atau freeze dryer untuk menghasilkan ekstrak dalam bentuk serbuk. Pastikan ekstrak benar-benar kering sebelum disimpan dalam wadah kedap udara. Simpan ekstrak Daun Pegagan yang sudah jadi dalam wadah kedap udara, terlindung dari cahaya langsung, dan simpan pada suhu kamar atau dalam lemari pendingin untuk menjaga stabilitas dan kualitasnya.

4.5.3. Pembuatan Gel

Larutkan Carbopol dalam air distilasi dengan menggunakan pengaduk magnetik hingga tercampur merata. Tambahkan gliserin ke dalam larutan tersebut untuk meningkatkan viskositas dan kehalusan gel. Pemanasan larutan dapat dilakukan jika diperlukan untuk mempercepat proses pelarutan, tetapi pastikan suhu tidak terlalu tinggi agar tidak merusak bahan aktif.

Setelah larutan gel base siap, tambahkan ekstrak Daun Pegagan sebanyak 10% ke dalam larutan. Aduk campuran dengan pengaduk magnetik hingga ekstrak terdispersi secara homogen dalam gel base. Pastikan pengadukan dilakukan secara perlahan dan merata untuk menghindari pembentukan gelembung udara. Gel dikemas ke dalam wadah yang bersih dan steril. Simpan gel di tempat yang sejuk dan kering untuk menjaga kualitas dan efektivitasnya.

4.5.4. Penetapan Dosis

Dosis pemberian gel ekstrak daun Pegagan secara topical pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 10%. Penggunaan topikal gel ekstrak daun Pegagan dilakukan setiap hari selama 14 hari sebanyak 100mg/tikus.²⁷ Pemberian dosis air alkali diberikan secara oral menggunakan dosis 3 kali 2ml perhari.²⁶

4.5.5. Pembagian Kelompok

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus sampel

- KI : Tikus dipapar UVB
- K2 : Tikus dipapar UVB dan diberi *Hyaluronic Acid* oles
- K3 : Tikus dipapar UVB dan diberi gel ekstrak Daun Pegagan 10% oles
- K4 : Tikus dipapar UVB dan diberi air alkali per oral 3 kali 2ml
- K5 : Tikus dipapar UVB dengan diberi gel ekstrak Daun Pegagan 10% dan kombinasi air alkali per oral 3 kali 2m

4.5.6. Penyinaran UVB pada subjek penelitian

Dalam penelitian ini, tikus-tikus jantan galur Wistar mengalami proses aklimatisasi selama 7 hari untuk memastikan mereka beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Setelah periode aklimatisasi, tikus-tikus tersebut dikelompokkan berdasarkan desain penelitian. Selanjutnya, tikus- tikus dibius dengan campuran

ketamine 60mg/kg dan xylazine (20mg/kgbb). Lalu rambut pada bagian dorsal tikus dicukur hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm, paparan dilakukan dipunggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160mJ/cm²/hari yang dipapar sekitar 8menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu, sehingga total terdapat 10 kali penyinaran.

4.5.7. Validasi Hewan Coba

1. Makroskopis

Validasi makroskopis dilakukan untuk melihat ada tidaknya kerutan atau model *collagen loss* pasca penyinaran sinar UVB. Validasi ini untuk menilai kerusakan kolagen pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan tikus yang tidak terpapar UVB.

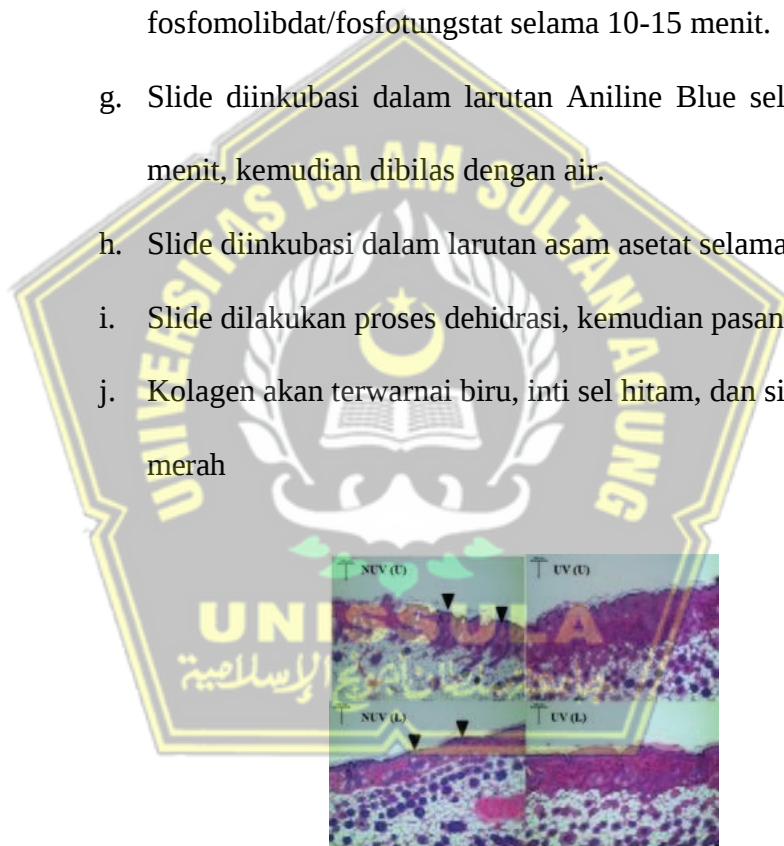
2. Mikroskopis

Validasi histologi pada tikus yang telah mengalami *collagen loss* dilakukan metode pengecatan Masson Trichome sebagai berikut :

- a. Slide jaringan dideparafinisasi.
- b. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.
- c. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, dibilas dengan air

mengalir.

- d. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.
- e. Slide diinkubasi dalam larutan Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
- f. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
- g. Slide diinkubasi dalam larutan Aniline Blue selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
- h. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
- i. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang desk glass.
- j. Kolagen akan terwarnai biru, inti sel hitam, dan sitoplasma merah



Gambar 4.2. Pengecatan Masson Trichrome pada tikus yang di papar sinar UV dan yang tidak di papar sinar UV.⁶⁹

4.5.8. Pengambilan Sampel Jaringan Kulit

Setelah pemberian perlakuan, dilakukan pengambilan jaringan. Sebelumnya semua tikus wistar dimatikan terlebih dahulu dengan cara pembiusan. Buat sayatan jaringan pada bagian kulit yang di

papar sinar UVB, ukuran 2x2 cm menggunakan gunting dan pinset. Sampel jaringan dipotong dan ditimbang, jaringan ditambahkan dengan PBS (PH 7,4). Kemudian sampel jaringan di homogenisasi (dihancurkan) dalam kondisi dingin, 4°C, selanjutnya setrifus dengan kecepatan 2000-3000 rpm, selama 20 menit. Kemudian supernatan yaitu substansi hasil sentrifugasi yang memiliki bobot jenis yang lebih rendah diambil dan digunakan sebagai sampel uji, sampel dapat disimpan pada suhu -20°C.

4.5.9. Analisis SOD dan IL-10

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) dan IL-10 menggunakan metode ELISA. Analisis ELISA SOD dan IL-10 dilakukan sesuai dengan prosedur yang terdapat dalam petunjuk regensia analisis kadar SOD dan IL-10 menggunakan alat *microplater reader* dengan panjang gelombang 450nm.

Tahapan pemeriksaan *Superoxide Dismutase* (SOD), sebagai berikut:

1. Persiapan Reagen:

- Larutkan *enzyme stock solution* dengan *enzyme diluent* di atas es.
- Siapkan *substrate application solution* dan *enzyme working solution* sesaat sebelum digunakan.

2. Persiapan Sampel:

- Jaringan: Homogenisasi 20 mg jaringan dalam PBS, lalu sentrifugasi dan ambil supernatan.

3. Langkah Pengujian:

- Tambahkan 20 μ L air suling dan 20 μ L *enzyme working solution* ke sumur kontrol.
- Tambahkan 20 μ L sampel dan 20 μ L *enzyme working solution* ke sumur sampel.
- Tambahkan 200 μ L substrate application solution ke semua sumur.
- Inkubasi pada 37°C selama 20 menit.
- Baca nilai OD pada 450 nm menggunakan *microplate reader*.

4. Perhitungan:

- Hitung rasio inhibisi SOD dan aktivitas SOD dengan rumus yang disediakan sesuai dengan tipe sampel

Tahapan pemeriksaan IL-10, sebagai berikut :

1. Penentuan Posisi Sampel dan Standar:

- Tentukan sumur untuk standar, sampel kosong (blank), dan sampel yang diuji.
- Tambahkan 100 μ L masing-masing standar, sampel kosong, dan sampel uji ke dalam sumur yang sesuai.

2. Inkubasi Awal:

- Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C dengan menutup

pelat menggunakan sealer yang disediakan.

3. Penambahan Antibodi Deteksi Biotinilasi:

- Buang cairan dari setiap sumur tanpa mencucinya.
- Tambahkan 100 μL larutan kerja antibodi deteksi biotinilasi ke setiap sumur.
- Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

4. Proses Pencucian:

- Buang larutan dari setiap sumur, tambahkan 350 μL wash buffer ke setiap sumur, rendam selama 1 menit, dan aspirasi atau buang larutannya.
- Ulangi proses pencucian ini 3 kali.

5. Penambahan HRP (*Horseradish Peroxidase*) Konjugat:

- Tambahkan 100 μL larutan kerja HRP konjugat ke setiap sumur.
- Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

6. Pencucian Ulang:

- Buang larutan dari setiap sumur, kemudian ulangi proses pencucian sebanyak 5 kali.

7. Penambahan Substrat:

- Tambahkan 90 μL reagen substrat ke setiap sumur, inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37°C dalam kondisi terlindung dari cahaya.

8. Penambahan Stop Solution:

- Tambahkan 50 μL larutan penghenti (*stop solution*) ke setiap sumur.

9. Pengukuran OD:

- Ukur densitas optik (OD) setiap sumur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.⁶⁸

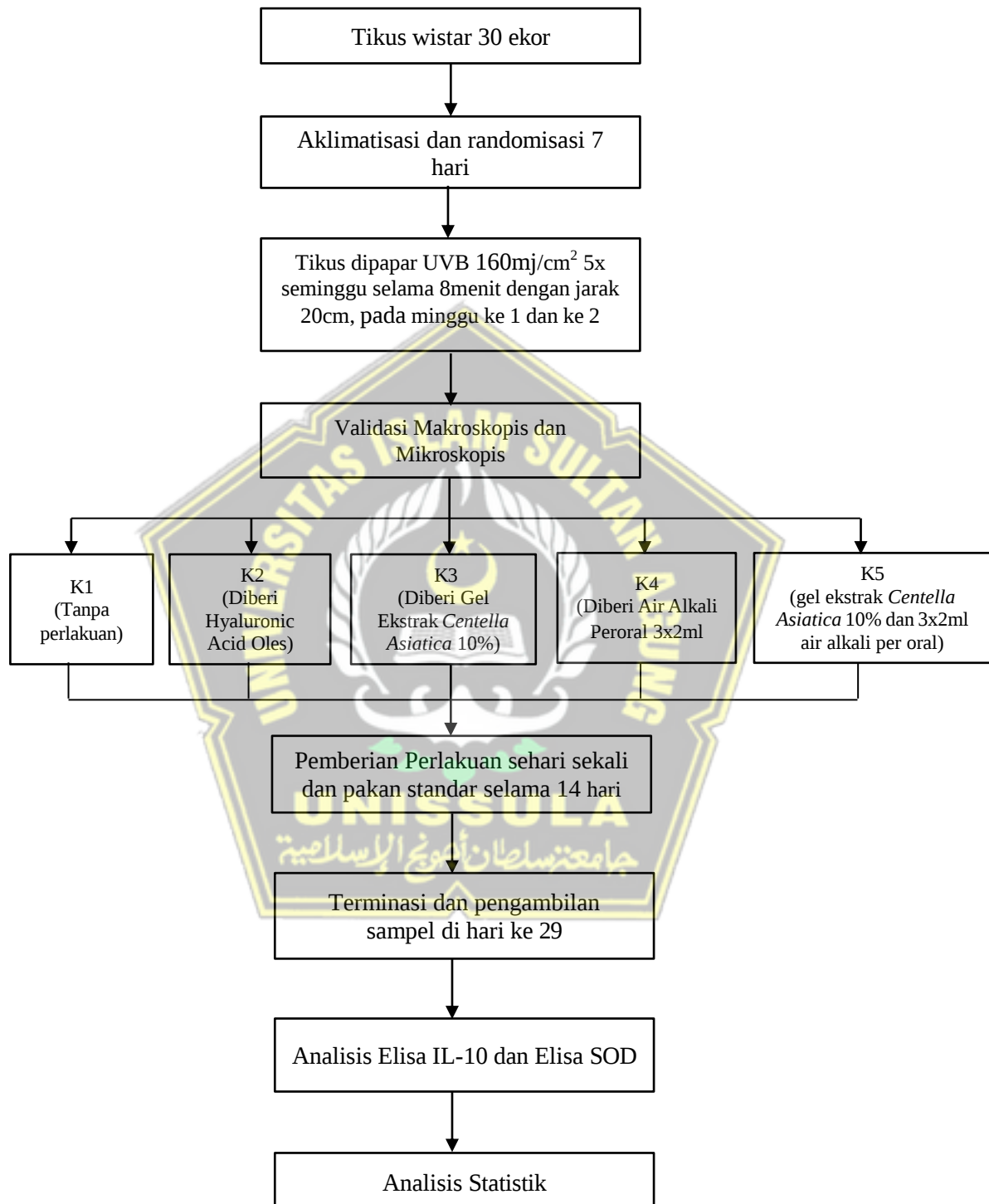
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di labolatorium SCCR Indonesia Semarang yang meliputi pembuatan ekstrak, pemeliharaan, induksi, dan perlakuan hewan coba pada bulan November – Desember 2024.

4.7. Analisa Data

Data kadar SOD dan IL 10 disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis normalitas dan variasi data dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk dan Levene's test. Data yang dihasilkan pada kadar SOD dan kadar IL10 normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($P < 0,05$) maka dilakukan uji One-Way ANOVA. Hasil uji One-Way ANOVA terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok penelitian, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tamhane, digunakan untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Hasil uji post hoc Tamhane, kadar SOD dan kadar IL10 terdapat perbedaan signifikan $p < 0,05$ terhadap semua kelompok perlakuan. Pengolahan analisis data ini menggunakan aplikasi SPSS series 29.0.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

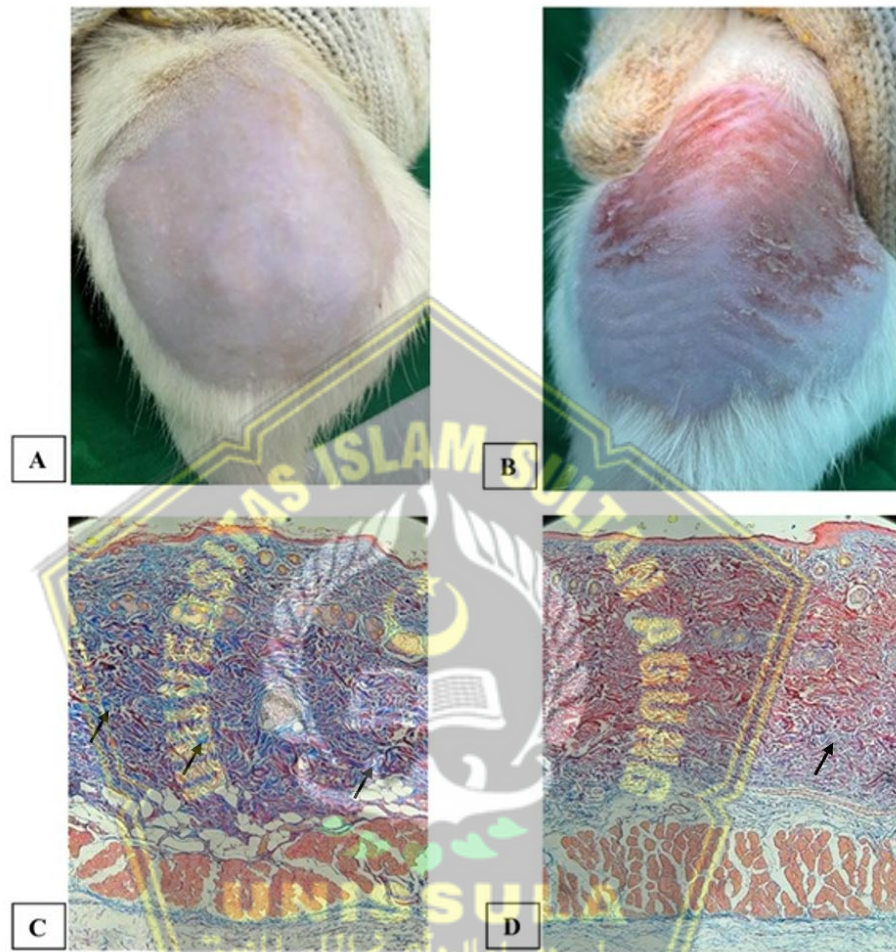
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan November hingga Desember 2024 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus wistar jantan model *collagen loss* yang dipapar UVB 302 nm dengan dosis 160 mJ/cm² sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu selama 2 minggu. Pada penelitian ini di bagi menjadi 5 kelompok yaitu, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diberikan perlakuan gel *hyaluronic acid* (HA) 200mg, kelompok perlakuan 1 yang diberikan perlakuan gel ekstrak daun pegagan 10% (EDP 10%), kelompok perlakuan 2 yang diberikan perlakuan air alkali secara oral 3 kali 2ml, dan kelompok perlakuan 3 yang diberikan kombinasi perlakuan gel EDP 10% dan air alkali secara oral 3 kali 2 ml. Pada penelitian ini dilakukan validasi *collagen loss* dan terbukti bahwa pemberian sinar UVB dengan dosis tersebut mampu menyebabkan *collagen loss*. Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa pemberian EDP 10% dan kombinasi dengan air alkali dapat meningkatkan kadar IL-10 dan kadar SOD.

Hasil pengamatan secara anatomis terlihat bahwa pada tikus yang mendapatkan paparan sinar UVB pada hari ke-15 pengamatan, kulit bagian dorsal terjadi kemerahan eritema dan kerutan jika dibandingkan kelompok sehat (Gambar 5.1 A-B). Pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan *masson trichome* untuk mewarnain kolagen dilakukan pada hari ke 15 untuk melihat adanya *collagen loss* akibat paparan UVB. Hasil pengamatan terlihat adanya

collagen loss pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar (Gambar 5.1 C-D).



Gambar 5.1. Validasi kolagen (A) Tidak terdapat kemerahan dan kerutan pada tikus sehat, (B) Tampak memerah dan kerutan pada tikus yang dipapar sinar UVB, (C) *Masson Trichrome* dengan warna biru yang menandakan adanya produksi kolagen pada tikus sehat, dan (D) kulit tikus yang dipapar sinar UVB menunjukkan warna merah yang menandakan ekspresi kolagen terhambat (D).

Dalam penelitian ini, ekstraksi daun pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol, yang menghasilkan rendemen sebesar 8,09%. Berdasarkan hasil analisis fitokimia secara kualitatif, ekstrak daun pegagan terbukti mengandung beberapa golongan senyawa bioaktif, meliputi alkaloid, fenolik,

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil

idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d

terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind

sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli

tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm

Homogenitas pada Kadar IL-10

Kelompok

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil

idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d

terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind

sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli

tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm

Homogenitas pada Kadar IL-10

Kelompok

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil

idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d

terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind

sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli

tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm

Homogenitas pada Kadar IL-10

Kelompok

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil

idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d

terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind

sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli

tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm

Homogenitas pada Kadar IL-10

Kelompok

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil

idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d

terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind

sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli

tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm

Homogenitas pada Kadar IL-10

Kelompok

an antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memil
idan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

Hasil Penelitian

1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan

Alkali terhadap Kadar IL-10

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan d
terhadap kadar IL-10 pada tikus galur wistar yang di ind
sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil peneli
tertera pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Norm
Homogenitas pada Kadar IL-10**

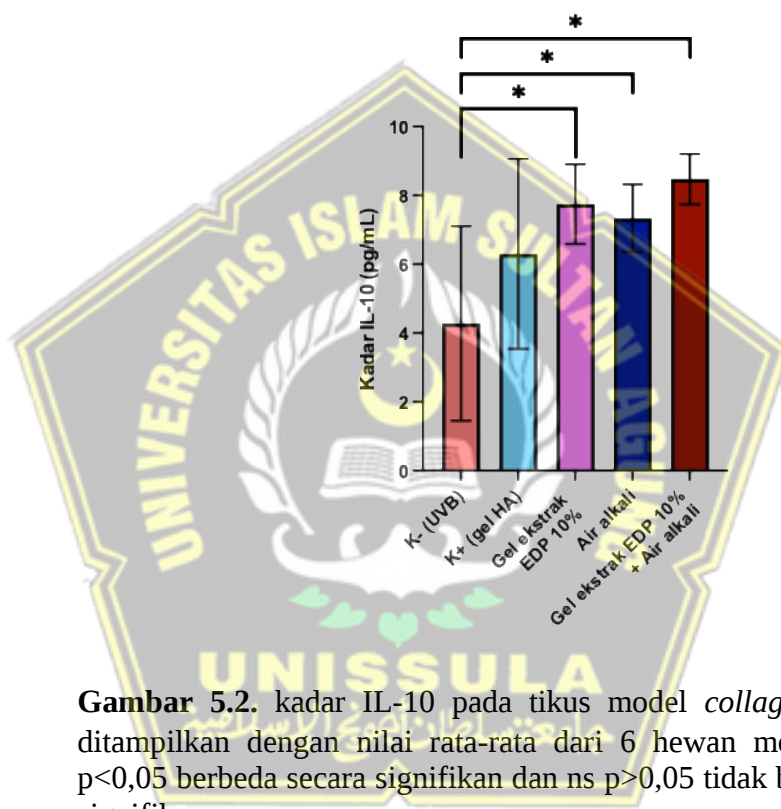
Kelempok

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar IL-10 tertinggi pada kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali sebesar $8,4710 \pm 0,7312$. Diikuti oleh kelompok pemberian tunggal ekstrak daun pegagan 10% sebesar $7,7418 \pm 1,1568$. Pada kelompok pemberian air alkali tunggal juga terlihat meningkatkan kadar IL-10 hingga $7,3365 \pm 0,9780$. Pada kelompok kontrol positif HA mengalami sedikit peningkatan kadar IL-10 hingga $6,3023 \pm 2,7616$. Kelompok kontrol negatif memiliki kadar IL-10 terendah yaitu $4,2773 \pm 2,8268$. Seluruh kelompok rerata kadar IL-10 berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p-value* $> 0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang tidak homogen dengan nilai *p-value* ($p < 0,05$). Sebaran data normal dan tidak homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,009 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi kadar IL-10 antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,080	0,004*	0,011*	0,001*
K2	0,080	-	0,206	0,360	0,062
K3	0,004*	0,206	-	0,718	0,517
K4	0,011*	0,360	0,718	-	0,316
K5	0,001*	0,062	0,517	0,316	-

**Uji Post hoc Tamhane dengan nilai signifikan $p < 0.05$*



Gambar 5.2. kadar IL-10 pada tikus model *collagen loss*. Data ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD. * $p < 0,05$ berbeda secara signifikan dan ns $p > 0,05$ tidak berbeda secara signifikan.

Hasil uji *post hoc tamhane* kadar IL-10 pada tabel 5.2 menunjukkan kadar IL-10 pada kelompok tikus kontrol negatif UVB terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok gel ekstrak daun pegagan 10% pada pemberian tunggal, kelompok pemberian tunggal air alkali dan terhadap kelompok pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Berdasarkan data diatas dapat

Rerata kadar SOD mengalami peningkatan pada semua kelompok perlakuan baik perlakuan kontrol positif HA, perlakuan tunggal gel ekstrak daun pegagan 10%, air alkali, dan kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Peningkatan tertinggi kadar SOD pada pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% sebesar $135,773 \pm 15,082$. Pada kelompok perlakuan lainnya memiliki kadar SOD ~ 132 pg/mL. Kelompok kontrol negatif yang hanya di paparkan sinar UVB memiliki kadar SOD $71,978 \pm 40,723$ (Tabel 5.3).

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Kadar SOD						
Mean	71,978	132,248	135,773	132,615	132,897	
Std.deviasi	40,723	9,778	15,082	14,037	6,572	
<i>Shapiro Wilk</i>	0,197*	0,184*	0,667*	0,245*	0,566*	
<i>Levene test</i>						0,001
<i>One Way</i>						0,001***
<i>ANOVA</i>						
Keterangan:	*Normal	p>0,05	**Homogen	p>0,05	***Signifikan	
	p<0,05					

Seluruh kelompok kadar SOD berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p-value* $>0,05$ dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data tidak homogen dengan nilai *p-value* 0,001 ($p<0,05$). Sebaran data normal dan tidak homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,001 ($p<0,05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

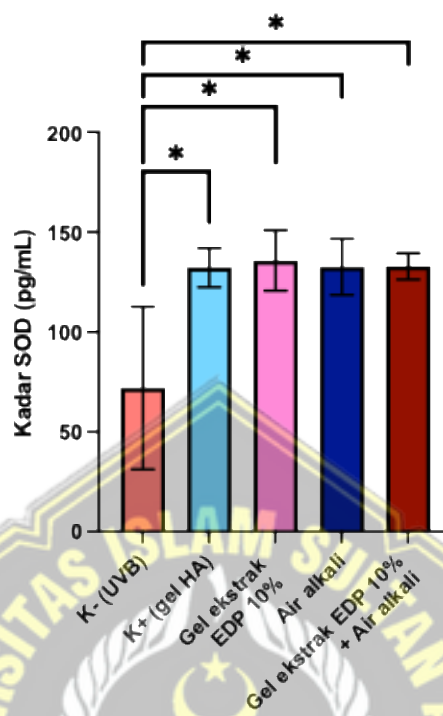
Tabel 5.4. Perbedaan kadar SOD antara kelompok penelitian

	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
K2	0,001*	-	0,775	0,976	0,958
K3	0,001*	0,775	-	0,797	0,815
K4	0,001*	0,976	0,797	-	0,982
K5	0,001*	0,958	0,815	0,982	-

*Uji Post hoc Tamhane dengan nilai signifikan $p<0.05$

Hasil uji *post hoc Tamhane* pada tabel 5.4 menunjukkan kadar SOD pada kelompok tikus kontrol negatif yang dipapar sinar UVB tanpa perlakuan terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok yang diberi Hyaluronic Acid, kelompok yang diberi gel ekstrak daun pegagan 10%, kelompok yang diberi air alkali dan kelompok yang diberi kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali berpengaruh secara signifikan terhadap kadar SOD pada tikus jantan galur wistar

yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.3. Kadar SOD pada tikus model *collagen loss*. Data ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD. * $p < 0,05$ berbeda secara signifikan dan ns $p > 0,05$ tidak berbeda secara signifikan.

5.2. Pembahasan

Paparan UV-B akut dapat menyebabkan respon inflamasi dan stress oksidatif akut pada kulit. Proses ini melibatkan penurunan ekspresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan penurunan enzim antioksidan SOD⁷⁴. Inflamasi setelah paparan UVB melibatkan beberapa jalur sinyal yaitu jalur sinyal NF- κ B yang selanjutnya memicu ekspresi matriks metalloproteinase (MMPs) sehingga menginduksi degradasi kolagen^{75,76}. Pemberian senyawa antiinflamasi dan antioksidan dapat menurunkan sitokin proinflamasi dan memicu ekspresi enzim antioksidan sehingga menunjukkan efek perbaikan kolagen yang baik pada kulit. Penurunan stres oksidatif dan inflamasi akibat

paparan sinar UVB akut dapat dicegah dengan berbagai senyawa yang mampu menyeimbangkan radikal seperti senyawa flavonoid ⁷⁷. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal maupun dikombinasi dengan air alkali dapat meningkatkan kadar IL-10 dan SOD.

Ekstrak daun pegagan mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan triterpenoid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dimana dapat menekan keseimbangan level ROS dengan cara meningkatkan pembentukan sistem antioksidan sehingga dapat menekan inflamasi ⁷⁸⁻⁸⁰. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa senyawa flavonoid menekan produksi stress oksidatif dengan menyeimbangkan O₂ radikal ⁷⁷. Senyawa flavonoid dapat menginduksi pelepasan SOD, SOD merupakan enzim yang dapat menekan ROS dengan mekanisme menghasilkan oksigen molekuler dari oksidasi hidrogen peroksida yang disebut disproporsionasi. Aktivitas enzim SOD bergantung pada konformasi struktural dari tiga domain esensial, bagian heme pada sisi aktif, ikatan NADPH yang tereduksi dalam domain pengikatan NADPH dan struktur sekunder kompleks yang dibentuk oleh jalinan dan jalinan loop peptida panjang selama tetramerisasi ⁸¹. Disisi lain, kondisi inflamasi akibat UVB dapat diturunkan dengan peningkatan kadar sitokin anti-inflamasi IL-10 pada akhirnya dapat mengurangi ekspresi MMP, sehingga menjaga keutuhan densitas struktur kolagen pada kulit yang rusak akibat UVB ⁸². Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa daun pegagan dapat menghambat

aktivitas MMPs sehingga mencegah degradasi ekstra seluler matriks (ECM)^{83,84}.

Pada penelitian ini pemberian dosis tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dapat meningkatkan kadar SOD dan kadar IL-10. Pada pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dapat meningkatkan kadar IL-10 paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Pada hasil penelitian ini memiliki nilai standart deviasi yang cukup lebar sehingga pada kadar IL-10 kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif tidak berbeda signifikan, hal ini disebabkan setiap hewan uji memiliki respon yang berbeda-beda, kondisi fisiologis tiap hewan dapat bervariasi meski dalam kelompok penelitian yang sama, dan dapat disebabkan perbedaan tingkat stres pada hewan uji⁸⁵. Kelompok kontrol positif pada penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektifitas gel ekstrak daun pegagan dan air alkali dengan terapi standart yang sudah terbukti dapat mencegah kehilangan kolagen. Hasil kadar IL-10 yang tidak berbeda signifikan antara kelompok kontrol negatif UVB dan kelompok kontrol positif hal ini dapat disebabkan karena kemungkinan mekanisme aksi HA dalam mencegah kolagen loss bukan melalui jalur antiinflamasi IL-10. Efektifitas yang ditunjukkan oleh kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali terhadap kerusakan kolagen akibat UVB pada penelitian ini sejalan dengan penelitian terdahulu mendemonstrasikan manfaat pH basa dalam meningkatkan stabilitas matriks ekstraselular kulit⁸⁶. Penelitian terdahulu melaporkan senyawa flavonoid

menginduksi peningkatan kadar SOD melalui ikatan hidrogen dengan Ser212 melalui gugus 3'-OH menyebabkan penghambatan aktivitas protein kinase kinase (MEK1). Flavonoid juga menghambat aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan mengaktivasi protein kinase (MAPK) untuk menginduksi ekspresi enzim antioksidan SOD⁷⁹. Adanya kemampuan senyawa golongan flavonoid sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang sinergis dengan kemampuan antioksidan air alkali membuktikan bahwa pemberian kombinasi ini dapat menurunkan degradasi kolagen akibat UVB. Air alkali juga memiliki sifat antioksidan yang dapat berkontribusi pada efek sinergis pada penelitian ini²⁶. Air alkali dapat membantu mempertahankan pH optimal untuk aktivitas SOD dalam menjaga keseimbangan oksidatif dikulit²⁶. Kemampuan memperbaiki kondisi *collagen loss* pada penelitian ini akibat penurunan peningkatan enzim antioksidan SOD dan sitokin anti inflamasi IL-10 kemungkinan terjadi melalui mekanisme ganda, yaitu penghambatan jalur faktor transkripsi inflamasi NF- κ B dan efek antioksidan langsung dari ekstrak daun pegagan dan air alkali⁸⁶⁻⁸⁸. Hal ini konsisten dengan temuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan dapat menekan berbagai mediator inflamasi, termasuk IL-6, pada model inflamasi kulit^{89,90}. Temuan ini membuka perspektif baru dalam pengembangan sediaan topikal untuk perbaikan kolagen loss dengan potensi aplikasi yang lebih luas dalam penanganan kondisi inflamasi kulit lainnya.

Keterbatasan pada penelitian ini belum dilakuakn analisis terhadap gel ekstrak daun pegagan dengan variasi dan konsentrasi yang lebih besar untuk diamati bagaimana reaksi terhadap kadar SOD dan kadar IL-10 maupun parameter molekular lainnya. Hasil pada penelitian ini hanya terbatas pada model hewan coba tikus, perlu dilakukan penelitian lanjutan yang dapat dilanjutkan pada fase klinis untuk mengetahui pengaruh kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali secara oral terhadap kulit manusia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun Pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap kadar peningkatan kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.
2. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun Pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap peningkatan kadar *Interleukin - 10* (IL - 10) pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

6.2. Saran

1. Analisis terhadap gel ekstrak daun pegagan dengan variasi dan konsentrasi yang lebih besar untuk diamati bagaimana reaksi terhadap kadar SOD dan kadar IL-10 maupun parameter molekular lainnya.
2. Penelitian dapat dilanjutkan pada fase klinis untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak daun pegagan dan air alkali secara oral terhadap kulit manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yang CY, Guo Y, Wu WJ, Man MQ, Tu Y, He L. UVB-Induced Secretion of IL-1 β Promotes Melanogenesis by Upregulating TYR/TRP-1 Expression In Vitro. *Biomed Res Int* 2022; **2022**. doi:10.1155/2022/8230646.
2. Wölflle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
3. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci*. 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
4. Sollberger G, Strittmatter GE, Grossi S, Garstkiewicz M, Auf Dem Keller U, French LE *et al*. Caspase-1 activity is required for UVB-induced apoptosis of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2015; **135**: 1395–1404.
5. Verschooten L, Smaers K, Van Kelst S, Proby C, Maes D, Declercq L *et al*. The flavonoid luteolin increases the resistance of normal, but not malignant keratinocytes, against UVB-induced apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; **130**: 2277–2285. Holman DM, Ding H, Guy GP, Watson M, Hartman AM, Perna FM. Prevalence of sun protection use and sunburn and association of demographic and behavioral characteristics with sunburn among US adults. *JAMA Dermatol* 2018; **154**: 561–568.
6. Choi MJ, Zheng HM, Kim JM, Lee KW, Park YH, Lee DH. Protective effects of Centella asiatica leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Mol Med Rep* 2016; **14**: 4521–4528.
7. Bowers JM, Hamilton JG, Lobel M, Kanetsky PA, Hay JL. Sun Exposure, Tanning Behaviors, and Sunburn: Examining Activities Associated With
8. Harmful Ultraviolet Radiation Exposures in College Students. *Journal of Primary Prevention* 2021; **42**: 425–440.
9. Pamudji R. Hubungan Tingkat Pendidikan dengan Pengetahuan Pekerja di Palembang Mengenai Penggunaan Tabir Surya. 2017.
10. García-Gavín J, González-Vilas D, Fernández-Redondo V, Toribio J. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis* 2010; **62**: 63–64.

11. Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
12. Sarkar R, Bhalla M, Kanwar AJ. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatology* 2002; **205**: 249–254.
13. Lin P, Shi H yu, Lu Y ying, Lin J. Centella asiatica alleviates psoriasis through JAK/STAT3-mediated inflammation: An in vitro and in vivo study. *J Ethnopharmacol* 2023; **317**. doi:10.1016/j.jep.2023.116746.
14. Sutardi S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 2017; **35**: 121.
15. Bajgai, J. et al. Effects of Drinking Electrolyzed Alkaline-Reduced Water on Functional Dyspepsia: A Randomized, Double-Blind, Controlled Prospective Trial. *Processes* 11, (2023).
16. Hafiz ZZ, Mohd Amin MA, Johari James RM, Teh LK, Salleh MZ, Adenan MI. Inhibitory Effects of Raw-Extract Centella asiatica (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress Activities via in Vitro and in Vivo. *Molecules* 2020; **25**. doi:10.3390/molecules25040892.
17. An IS, An S, Choe TB, Kang SM, Lee JH, Park IC *et al.* Centella asiatica protects against UVB-induced HaCaT keratinocyte damage through microRNA expression changes. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 1349–1356.
18. Ying Wang et Al, Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* (2018) 217 (6): 1915–1928
19. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid, a key molecule in skin aging. *DermatoEndocrinol.* 2012;4:253–8.
20. Oe M, Sakai S, Yoshida H, Okado N, Kaneda H, Masuda Y, Urushibata O. Oral hyaluronan relieves wrinkles: a double-blinded, placebo-controlled study over 12-week period. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2017;10:267–73.
21. Nobel PW, Liang J, Jiang D. Hyaluronan as an immune regulator in human disease. *Physiol Rev.* 2011;2011(91):221–64.
22. Kim DS, et al. Synergistic effects of using novel home-use-660- and 850 nm light emitting diode mask in combination with hyaluronic acid ampoule on photoaged Asian skin. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19:2606–15.

23. Longas MO, Russell CS, He HY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic
24. IL-10 Cytokine Family Signaling Pathway [Internet]. www.rndsystems.com. R&D Systems; 2017. Available from: <https://www.rndsystems.com/pathways/il-10-cytokine-family-signaling-pathway>
25. DEVIRIANDRA, Yoana Rizki. Perbandingan Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dan Simvastatin terhadap Kadar IL-10 (Interleukin-10) pada Tikus Model Hiperkolesterolemia - Repository Universitas Jenderal Soedirman. Unsoedacid [Internet]. 2024 Jan 17 [cited 2024 Nov 8]; Available from: <http://repository.unsoed.ac.id/25187>
26. Lee, M. *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes* **10**, (2022).
27. Fernando Venesia, N., Fachrial, E., Nyoman, I., & Lister, E. (2020). Effectiveness Test of *Centella Asiatica* Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (*Rattus Norwegicus* Wistar). *Technology, and Sciences (ASRJETS) American Scientific Research Journal for Engineering*, 65(1), 98–107. (2020).
28. Yap, C. K. *et al.* Antioxidant Enzyme Activities as Biomarkers of Cu and Pb Stress in *Centella asiatica*. *Stresses* **1**, 253–265 (2021).
29. Sun B, Wu L, Wu Y, Zhang C, Qin L, Hayashi M, et al. Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Sep 4;11.
30. Suvesh Munakarmi, Yamuna Gurau, Shrestha J, Prabodh Risal, Ho Sung Park, Lee GH, et al. Synergistic Effects of *Vitis vinifera* L. and *Centella asiatica* against CCl₄-Induced Liver Injury in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Jul 9;24(14):11255–5.
31. Pakdeechote P, Bunbupha S, Kukongviriyapan U, Prachaney P, Khrisanapant W, Kukongviriyapan V. Asiatic Acid Alleviates Hemodynamic and Metabolic Alterations via Restoring eNOS/iNOS Expression, Oxidative Stress, and Inflammation in Diet-Induced Metabolic Syndrome Rats. *Nutrients*. 2014 Jan 16;6(1):355–70.
32. Case, A. J. On the origin of superoxide dismutase: An evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. *Antioxidants* **6**, (2017).
33. Gusti, A. M. T., Qusti, S. Y., Alshammari, E. M., Toraih, E. A. & Fawzy, M. S. Antioxidants-related superoxide dismutase (Sod), catalase (cat), glutathione peroxidase (gpx), glutathione-s-transferase (gst), and nitric oxide synthase (nos)

- gene variants analysis in an obese population: A preliminary case-control study. *Antioxidants* **10**, (2021).
34. Su, W. *et al.* Genome-wide analysis and expression profile of superoxide dismutase (Sod) gene family in rapeseed (*brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants* **10**, (2021).
 35. Li, J., Wang, Z., Fan, M., Hu, G. & Guo, M. Potential Antioxidative and Anti-Hyperuricemic Components Targeting Superoxide Dismutase and Xanthine Oxidase Explored from *Polygonatum Sibiricum* Red. *Antioxidants* **11**, (2022).
 36. Zheng, M. *et al.* The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants* **12**, (2023).
 37. Hoffman, T. R. *et al.* Assessing Curcumin Uptake and Clearance and Their Influence on Superoxide Dismutase Activity in *Drosophila melanogaster*. *BioTech* **12**, (2023).
 38. Caruso, F. *et al.* Aromatic Polyphenol π - π Interactions with Superoxide Radicals Contribute to Radical Scavenging and Can Make Polyphenols Mimic Superoxide Dismutase Activity. *Curr. Issues Mol. Biol.* **44**, 5209–5220 (2022).
 39. Martinez-Espinosa, I., Serrato, J. A. & Ortiz-Quintero, B. Role of il-10-producing natural killer cells in the regulatory mechanisms of inflammation during systemic infection. *Biomolecules* **12**, (2022).
 40. Nakao, M. *et al.* Tlr2 deficiency exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation through decrease in regulatory t cells and impaired il-10 production. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–15 (2020).
 41. Sulistyawati, S.W., Basuki, S. & Dachlan, Y.P. Ekspresi mRNA Interleukin 10 (Il-10) dalam kaitanya dengan patogenesis malaria berat pada mencit strain BALB/C yang diinfeksi plasmpodium yoeli 17XL.J Biosains Pascasarj.20,170(2018)
 42. Zhao, Y. *et al.* Effect of *centella asiatica* on oxidative stress and lipid metabolism in hyperlipidemic animal models. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, (2014).
 43. Shukurova, M. K., Myint, D., Yi, S. S., Saw, O. M. & Watanabe, K. N. Morphological Description and Ethnobotanical Review of the Orphan Crop Myin-Hkwa (*Centella asiatica* L.) From Myanmar. *Front. Sustain. Food Syst.* **5**, 1–9 (2021).
 44. Chachai, N. *et al.* Variability of morphological and agronomical characteristics of *centella asiatica* in Thailand. *Trends Sci.* **18**, 1–10 (2021).

45. Tan, S. C., Bhattamisra, S. K., Chellappan, D. K. & Candasamy, M. Actions and therapeutic potential of madecassoside and other major constituents of *centella asiatica*: A review. *Appl. Sci.* **11**, (2021).
46. Wiciński, M. *et al.* Can Asiatic Acid from *Centella asiatica* Be a Potential Remedy in Cancer Therapy?—A Review. *Cancers (Basel)*. **16**, 1–17 (2024).
47. CU, O.-N., FU, I., J, A., OJ, P. & PH, W. Nutrient and Phytochemical Composition of *Centella asiatica* Leaves. *Med. Aromat. Plants* **9**, (2020).
48. Mishra, A. *et al.* Ethano-pharmacology activity & Antioxidant activity of *Centella asiatica* Plant Parts. *Neuroquantology* **20**, (2022).
49. Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J. & Kochhar, T. A Systematic Review of the Effect of *Centella asiatica* on Wound Healing. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, (2022).
50. Wicaksono, S.A., Nabyala, H.D., Sulistyati, B.U., The Effect Of Alkaline Reduce Water Administration to The Fasting Blood Glucose Level In Patients with Type 2 diabetes mellitus, *Int. J. Anesthesiology and intensive care, diponogoro university* (2020).
51. Brauns, J. & Turek, T. Alkaline water electrolysis powered by renewable energy: A review. *Processes* **8**, (2020).
52. Anbualakan, K. *et al.* A Scoping Review on the Effects of Carotenoids and Flavonoids on Skin Damage Due to Ultraviolet Radiation. *Nutrients* **15**, 1–17 (2023).
53. Jo, S. *et al.* Oral administration of *rosa gallica* prevents UVB-induced skin aging through targeting the c-raf signaling axis. *Antioxidants* **10**, (2021).
54. Abdallah, H. M. *et al.* Taif Rose Oil Ameliorates UVB-Induced Oxidative Damage and Skin Photoaging in Rats via Modulation of MAPK and MMP Signaling Pathways. *ACS Omega* **8**, 33943–33954 (2023).
55. Frommeyer, T. C. *et al.* UVB-Induced Microvesicle Particle Release and Its Effects on the Cutaneous Microenvironment. *Front. Immunol.* **13**, 1–16 (2022).
56. Bouceiro Mendes, R., Alpalhão, M. & Filipe, P. UVB phototherapy in the treatment of vitiligo: State of the art and clinical perspectives. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **38**, 215–223 (2022).

57. Hutapea CM, Prasetyowati Subchan, Putra A. Clitoria ternatea Flower Extract-Based Gel Elevates TGF- β 1 Gene Expression and Collagen Density in UVB-Induced *Collagen Loss* Rat Skin. Jurnal Kedokteran Brawijaya [Internet]. 2023 May 8 [cited 2024 Nov 8];148–53. Available from: <https://jkb.ub.ac.id/index.php/jkb/article/view/3300>
58. Tobin DJ. Introduction to skin aging. Journal of Tissue Viability. 2017 Feb;26(1):37–46.
59. Draelos, Z.D. et al., 2016, Cosmetic Dermatology: Products and Procedures. John Willey & Sons, Ltd. : West Sussex.p15
60. Farage, M. A., Miller, K. W., & Maibach, H. I. 2017, Textbook of aging skin. Springer Science & Business Media, 121-129.
61. Lim, K. M. Skin epidermis and barrier function. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–3 (2021).
62. Gratton, R., Del Vecchio, C., Zupin, L. & Crovella, S. Unraveling the Role of Sex Hormones on Keratinocyte Functions in Human Inflammatory Skin Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
63. Balderas-Cordero, D. *et al.* Anti-Inflammatory and Histological Analysis of Skin Wound Healing through Topical Application of Mexican Propolis. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1–19 (2023).
64. Méchin, M. C., Takahara, H. & Simon, M. Deimination and peptidylarginine deiminases in skin physiology and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–15 (2020).
65. Maglie R, de Araujo DSM, Antiga E, Geppetti P, Nassini R, De Logu F. The Role of TRPA1 in skin Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1–13.
66. Zhao, Z. Fattening in Saline and Alkaline Water Improves the Color ., (2022).
67. Hashim, P. The effect of *Centella asiatica*, vitamins, glycolic acid and their mixtures preparations in stimulating collagen and fibronectin synthesis in cultured human skin fibroblast. *Pak. J. Pharm. Sci.* **27**, 233–237 (2014).
68. ELISA Testing Assays from Elabscience [Internet]. Elabscience.com. 2023 [cited 2024 Nov 9]. Available from: <https://www.elabscience.com/products/elisa-kits>

69. Fan, Y., Jeong, J. H., You, G. Y., Park, J. U., Choi, T. H., & Kim, S. (2015). An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery*, 26(6), e467–e471. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000001902>
70. Su, W. *et al.* Genome-wide analysis and expression profile of superoxide dismutase (Sod) gene family in rapeseed (*brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants* **10**, (2021).
71. Case, A. J. On the origin of superoxide dismutase: An evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. *Antioxidants* **6**, (2017).
72. Li, J., Wang, Z., Fan, M., Hu, G. & Guo, M. Potential Antioxidative and Anti-Hyperuricemic Components Targeting Superoxide Dismutase and Xanthine Oxidase Explored from *Polygonatum Sibiricum* Red. *Antioxidants* **11**, (2022)
73. Oktavian Tamon, Aagp Wiraguna, Wimpie Pangkahila. Injeksi asam hialuronat di lapisan dermis menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 tikus yang dipajan sinar ultraviolet-B (UVB). *Jurnal Biomedik : JBM*. 2017 Mar 23;9(1).
74. Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
75. Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(4):325–34.
76. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994–1001.
77. Brunetti C, di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. p. 3540–55.
78. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016;5.
79. Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA, Savarimuthu I. Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. 2017;

80. Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci.* 2018;208(June):111–22.
81. Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia.* 2014;23(4):239–44.
82. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 120–5.
83. Schneider LA, Raizner K, Wlaschek M, Brenneisen P, Gethöffer K, Scharffetter-Kochanek K. UVA-1 exposure in vivo leads to an IL-6 surge within the skin. *Exp Dermatol.* 2017;26(9):830–2.
84. Hafiz ZZ, Mohd Amin MA, Johari James RM, Teh LK, Salleh MZ, Adenan MI. Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica* (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress Activities via in Vitro and in Vivo. *Molecules.* 2020 Feb 17;25(4).
85. Moolsap F, Tanasawet S, Tantisira M, Hutamekalin P, Tipmanee V, Sukketsiri W. Standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine release in skin keratinocytes by suppressing ERK1/2 pathways. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2020 Jun 1;10(6):273–80.
86. Antonio JM, Fadriquela A, Jeong YJ, Kim CS, Kim SK. Alkaline reduced water attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and innate immune response triggered by intestinal epithelial dysfunction. *Processes.* 2021 Oct 1;9(10).
87. Chen E, Liu G, Zhou X, Zhang W, Wang C, Hu D, et al. Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *FASEB Journal.* 2018;32(9):4917–29.
88. Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2015;16(10):4277–83.
89. Grande R, Pacella S, Di Giulio M, Rapino M, Di Valerio V, Cellini L, et al. NF- κ B mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/*Streptococcus mutans* co-cultured cells. *Clin Oral Investig.* 2015 May 1;19(4):841–9.

90. An IS, An S, Choe TB, Kang SM, Lee JH, Park IC, et al. Centella asiatica protects against UVB-induced HaCaT keratinocyte damage through microRNA expression changes. *Int J Mol Med*. 2012 Dec;30(6):1349–56.

