

PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) DAN AIR ALKALI SECARA ORAL TERHADAP EKSPRESI GEN *MATRIKS METALLOPROTEINASE-1* DAN *TUMOR NECROSIS FACTOR- α*
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Wistar Model *Collagen Loss*)

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:
Irma Pratiwy
MBK2322010386

PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2025

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) DAN AIR ALKALI SECARA ORAL TERHADAP EKSPRESI GEN *MATRIKS METALLOPROTEINASE-1* DAN *TUMOR NECROSIS FACTOR- α*

(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Wistar Model *Collagen Loss*)

Disusun oleh :

Irma Pratiwy

MBK2322010386

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 21 Januari 2025 dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I



Dr. dr. Hj. Chodidjah M.Kes
NIK. 210186023

Pembimbing II



Dr.dr.Eko Setiawan Sp.B, FINACS
NIK. 210113160

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula



Dr. dr. Eko Setiawan Sp.B, FINACS
NIK. 210113160

PERNYATAAN

Dengan ini saya 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, 14 Januari 2025

Yang menyatakan,



Irma Pratiwy

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 SECARA ORAL TERHADAP EKSPRESI GEN *MATRIKS METALLOPROTEINASE-1* DAN *TUMOR NECROSIS FACTOR- α* (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Wistar Model *Collagen Loss*).** 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 dan pembimbing

II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.

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. Prof. DR. Ir. Hj.Titek Sumarawati,M.Kes selaku penguji I dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
6. Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E.Subsp.D.K.E.,FINSDV, FAADV selaku penguji II dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med selaku penguji III dalam penelitian ini yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikirannya untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan thesis ini.
8. 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.
9. 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, 14 Januari 2025
Penulis,

Irma Pratiwy



ABSTRAK

Latar Belakang: Paparan kronik sinar UVB menyebabkan peningkatan sitokin pro-inflamasi TNF- α yang menyebabkan sintesis MMP-1 sehingga terjadi degradasi kolagen. Tujuan penelitian untuk menganalisis pengaruh pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan (EDP) dan air alkali (AA) terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus model *collagen loss* yang dipapar sinar UV-B.

Metode: Penelitian eksperimental *in-vivo posttest only control group design* dengan metode rancang acak lengkap. Subjek penelitian Tikus jantan Galur Wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus kontrol negatif dengan paparan UV-B 160mj/cm² 5 kali seminggu selama 2 minggu), K2 (tikus kontrol positif yang dipapar UV-B dan diberi perlakuan hyaluronic acid), K3 (mendapat perlakuan gel EDP 10%), K4 (mendapat perlakuan AA secara peroral) dan K5 (mendapat perlakuan kombinasi EDP dan AA). Analisis ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 dilakukan dengan metode qRT-PCR yang dilanjutkan dengan uji statistik deskriptif dilanjutkan dengan uji normalitas dan homogenitas, dan uji beda *one-way ANOVA* (MMP-1) dan uji *kruskal wallis* (TNF- α) menggunakan SPSS.

Hasil: Ekspresi gen TNF- α pada K1 $7,96 \times 10^{-05} \pm 0,00001$, K2 $8,73 \times 10^{-05} \pm 0,00008$, K3 $2,64 \times 10^{-05} \pm 0,00001$, K4 $8,23 \times 10^{-05} \pm 0,00007$, dan K5 $3,57 \times 10^{-05} \pm 0,00001$. Pada K5 secara signifikan menurunkan ekspresi gen TNF- α dibanding K1. Ekspresi gen MMP-1 pada K1 $0,00024 \pm 0,00011$, K2 $0,00013 \pm 0,00004$, K3 $0,000032 \pm 0,00001$, K4 $0,000034 \pm 0,00002$, dan K5 $0,000035 \pm 0,00001$. Pada K5 secara signifikan menurunkan ekspresi gen MMP-1 dibanding K2.

Kesimpulan: Pemberian gel EDP 10% dan air alkali berpengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus model collagen loss yang disinari UVB.

Kata Kunci: daun pegagan, air alkali, TNF- α , MMP-1, *collagen loss*

ABSTRACT

Background: Chronic UVB radiation exposure leads to an increase in pro-inflammatory cytokine TNF- α , which causes MMP-1 synthesis resulting in collagen degradation. To analyze the effect of combining *Centella asiatica* leaf extract (CALE) gel and alkaline water (AW) on TNF- α and MMP-1 gene expression in UVB-irradiated collagen loss rat models.

Methods: This in-vivo experimental study used a posttest-only control group design with a completely randomized method. Male Wistar rats were divided into 5 groups: K1 (negative control exposed to 160mj/cm² UVB 5 times a week for 2 weeks), K2 (positive control exposed to UVB and treated with hyaluronic acid), K3 (treated with 10% CALE gel), K4 (treated with oral AW), and K5 (treated with a combination of CALE and AW). TNF- α and MMP-1 gene expression was analyzed using qRT-PCR, followed by descriptive statistical analysis, normality, and homogeneity tests, and one-way ANOVA (MMP-1) and Kruskal-Wallis (TNF- α) tests using SPSS.

Results: TNF- α gene expression to K1 $7,96 \times 10^{-05} \pm 0,00001$, K2 $8,73 \times 10^{-05} \pm 0,00008$, K3 $2,64 \times 10^{-05} \pm 0,00001$, K4 $8,23 \times 10^{-05} \pm 0,00007$, and K5 $3,57 \times 10^{-05} \pm 0,00001$. Group K5 significantly reduced TNF- α gene expression compared to K1. MMP-1 gene expression to K1 $0,00024 \pm 0,00011$, K2 $0,00013 \pm 0,000004$, K3 $0,000032 \pm 0,00001$, K4 $0,000034 \pm 0,00002$, and K5 $0,000035 \pm 0,00001$. Group K5 significantly reduced MMP-1 gene expression compared to K2.

Conclusion: The administration of 10% CALE gel and alkaline water influences in TNF- α and MMP-1 gene expression in UVB-irradiated collagen loss rat models.

Keywords: *Centella asiatica* leaf, alkaline water, TNF- α , MMP-1, collagen loss

DAFTAR ISI

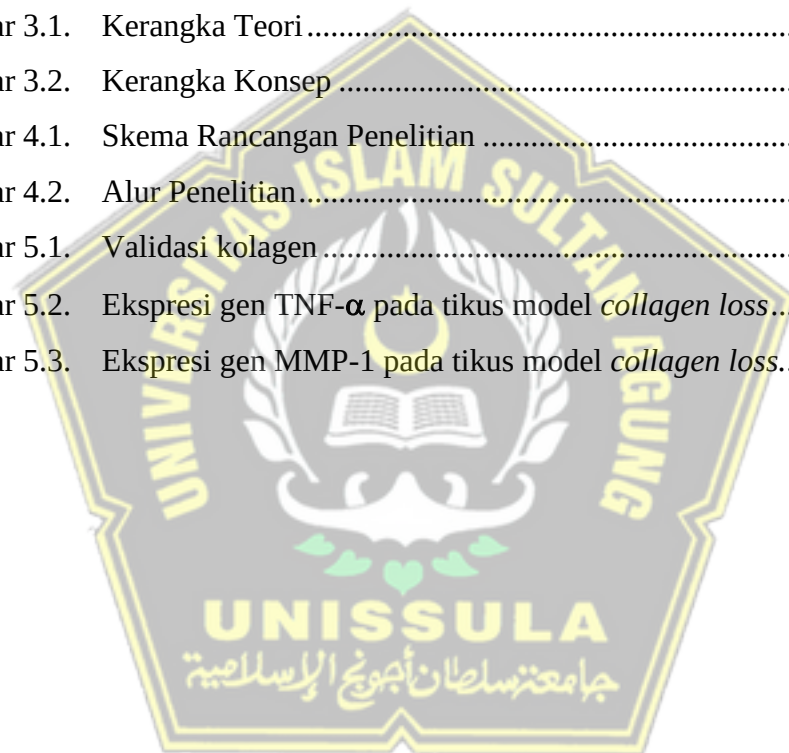
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (TNF- α)	10
2.1.1. Definisi TNF- α	10
2.1.2. Peran TNF- α pada <i>Collagen Loss</i>	11
2.2. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)	13
2.2.1. Definisi MMP-1.....	13
2.2.2. Peran MMP-1 pada Degradasi Kolagen	13
2.3. Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	16

2.3.1. Definisi Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	16
2.3.2. Peran Ekstrak <i>Centella asiatica</i> sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi	17
2.4. Air Alkali.....	20
2.4.1. Definisi Air Alkali.....	20
2.4.2. Peran Air Alkali dalam Mencegah Degradasi Kolagen	21
2.5. Kolagen	22
2.5.1. Definisi	22
2.5.2. Mekanisme Kerusakan Kolagen.....	25
2.5.3. Sintesis Kolagen	26
2.6. Efek Ekstrak <i>Centella asiatica</i> dan Air Alkali Terhadap Ekspresi Gen TNF- α dan MMP-1	29
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	32
3.1. Kerangka Teori.....	32
3.2. Kerangka Konsep	36
3.3. Hipotesis.....	36
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	37
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	38
4.2.1. Variabel Penelitian	38
4.2.2. Definisi Operasional	39
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	41
4.3.1. Subjek Penelitian	41
4.3.2. Sampel Penelitian	41
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian	42
4.3.4. Besar Sampel	43
4.4. Alat dan Bahan	43
4.4.1. Alat	43
4.4.2. Bahan.....	44
4.5. Cara Penelitian	44
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	44

4.5.2. Pembuatan Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	44
4.5.3. Pembuatan Gel Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	44
4.5.4. Model Collagen loss dengan Paparan UVB	45
4.5.5. Pengecekan Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen	46
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan.....	47
4.5.7. Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF- α dan MMP-1 menggunakan RT-PCR	48
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	49
4.7. Analisa Data	49
4.8. Alur Penelitian.....	50
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
5.1. Hasil Penelitian	53
5.1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap ekspresi gen TNF- α	53
5.1.2. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap ekspresi gen MMP-1.....	56
5.2. Pembahasan	60
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	64
6.1. Kesimpulan.....	64
6.2. Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Mekanisme degradasi kolagen akibat TNF- α	13
Gambar 2.2.	Mekanisme MMP-1 menginduksi degradasi kolagen	16
Gambar 2.3.	Daun Pegagan	17
Gambar 2.4.	Struktur Kimia <i>Flavonoid</i> dan jenis-jenisnya	19
Gambar 2.5.	Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua.	23
Gambar 2.6.	Mekanisme sintesis kolagen	29
Gambar 3.1.	Kerangka Teori	35
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	36
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	49
Gambar 5.1.	Validasi kolagen	52
Gambar 5.2.	Ekspresi gen TNF- α pada tikus model <i>collagen loss</i>	56
Gambar 5.3.	Ekspresi gen MMP-1 pada tikus model <i>collagen loss</i>	59



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1.	Komposisi Gel Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	45
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Non Parametrik <i>Kruskall Wallis</i> pada Ekspresi Gen TNF- α .	53
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi Gen TNF- α antara kelompok penelitian	55
Tabel 5.3.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Parametrik One Way ANOVA pada Ekspresi gen MMP-1 ...	57
Tabel 5.4.	Perbedaan Ekspresi Gen MMP-1 antara kelompok penelitian	58

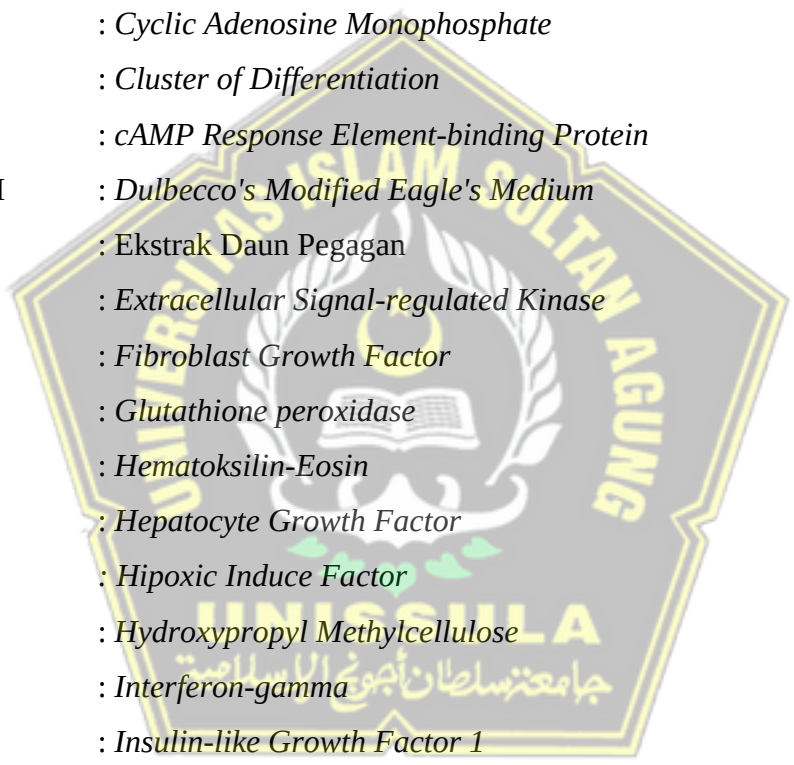


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	75
Lampiran 2. Sertifikat Izin Penelitian	76
Lampiran 3. Sertifikat Hasil Penelitian	79
Lampiran 4. Analisis Statistika	80
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	87



DAFTAR SINGKATAN



ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDP	: <i>Ekstrak Daun Pegagan</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>

MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
SOCS3	: <i>Supressor Of Cytokine Signaling 3</i>
SOD	: <i>SuperOxideDismutase</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Acitvator Transcription</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet B</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan sinar *Ultraviolet B* (UVB) yang diemisikan oleh matahari dapat memicu timbulnya berbagai masalah kulit seperti degradasi kolagen akibat peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS)¹. Peningkatan kadar ROS mengaktifasi sitokin pro-inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), dimana respon inflamasi ini merupakan pemicu proses degradasi kolagen²⁻⁴. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) yang disekresikan merangsang jalur pensinyalan *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) yang penting dalam memperkuat respon inflamasi dan mengatur ekspresi *Matriks Metalloproteinase Family* (MMPs)⁵. Overekspresi ROS juga menyebabkan abnormalitas *Activator-Protein 1* (AP-1) yang menghambat sintesis kolagen melalui pelepasan enzim MMPs termasuk MMP-1 sehingga menghambat sintesis kolagen^{6,7}. Lingkungan asam pada kulit akibat kadar ROS tinggi dapat menghambat sintesis *Extraceluler Matrix* (ECM), termasuk berkurangnya produksi kolagen akibat penghambatan sintesis matriks ekstraseluler (ECM)⁸. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* dengan dosis 10% dapat meningkatkan produksi kolagen dan menjaga elastisitas kulit yang terpapar sinar UVB⁹. Efektivitas sintesis kolagen dapat lebih ditingkatkan dengan mengatur pH kulit, di mana air alkali terbukti dapat mengatur pH tubuh dan memiliki tingkat antioksidan lebih tinggi dapat membantu melindungi kolagen dari kerusakan akibat

radikal bebas dan paparan UVB¹⁰. Potensi *Centella asiatica* sebagai antioksidan dan air alkali untuk menjaga kolagen menunjukkan bahwa kombinasi gel ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali memiliki kemampuan untuk mengoptimalkan induksi sintesis kolagen.

Pada tahun 2020, 4,2% dari 142 subjek positif mengalami penurunan kolagen setelah terpapar tiga kali dosis minimal eritema UVB (MED)¹¹. Kasus keriput meningkat secara signifikan pada tahun 2022, dengan ~100.350 kasus baru¹². Pengobatan standar untuk penurunan kolagen kulit melibatkan perlindungan dari paparan UVB dan perbaikan kerusakan jaringan menggunakan bahan kimia seperti 5-fluorouracil dan retinoid, yang dapat menyebabkan efek samping serius hingga kanker¹³. Pada kultur sel primer yang terpapar UVB, 40-60% menunjukkan peningkatan sitokin proinflamasi dan penurunan ekspresi berbagai *Growth Factor* seperti *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), TGF- β , dan *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), serta peningkatan ekspresi MMP-1¹⁴. Kondisi ini menghambat sintesis kolagen dan memicu proses inflamasi yang berkontribusi pada kehilangan kolagen^{15,16}.

Pemberian senyawa antiinflamasi dan antioksidan terbukti dapat menurunkan kadar ROS dan sitokin pro-inflamasi pada kulit sehingga dapat menghentikan inflamasi yang berujung pada penekanan degradasi kolagen¹⁷. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder telah terbukti memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti mempercepat penyembuhan luka dan luka bakar, mengobati

dermatitis atopik, mencegah *Collagen loss*^{18,19}. Penelitian *in vitro* dengan sel keratinosit manusia yang diterapi dengan nanokomposit mengandung ekstrak *Centella asiatica* dapat menghambat kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* yang mengandung asiaticoside menginduksi upregulasi TGF- β 1, smad2, dan smad3 pada sel fibroblast²⁰. Kemampuan *Centella asiatica* dalam meregulasi protein-protein tersebut dapat menginduksi myofibroblast menjadi fibroblast dan menyebabkan sintesis kolagen^{21,22}.

Air alkali mengandung tingkat antioksidan yang lebih tinggi, yang dapat membantu melindungi kolagen yang ada dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan paparan UVB¹⁰ pH asam pada kulit menginduksi aktivasi enzim MMPs dan merubah struktur kolagen yang menyebabkan degradasi kolagen semakin mudah⁸. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa air alkali mengandung tingkat antioksidan yang lebih tinggi, yang dapat membantu melindungi kolagen yang ada dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan paparan UVB¹⁰. Air alkali dengan dosis 10mL/kg berat badan tikus dapat membantu menjaga kolagen dengan mengurangi keasaman tubuh secara keseluruhan²³. Air alkali juga telah terbukti mengurangi cedera ginjal dan apoptosis sel, stres oksidatif, dan peradangan pada tikus model gagal ginjal. Hal ini menunjukkan bahwa air alkali memiliki potensi antioksidan yang kuat karena dapat menekan MDA dan menginduksi enzim antioksidan SOD, disisi lain air alkali selama 7 hari secara signifikan menurunkan ekspresi gen IL-1 β dan TNF- α ²⁴. Disisi lain,

air alkali dapat mengatur pH kulit menjadi lebih stabil sehingga mencegah terjadinya degradasi kolagen, degradasi kolagen terjadi pada kondisi kulit terlalu asam akibat penumpukan stress oksidatif^{25,26}.

Kombinasi gel ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali dimungkinkan memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan yang lebih kuat sehingga dapat mencegah *collagen loss* pada sel fibroblast kulit. Mekanisme molekuler yang mendasari aktivitas ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada *collagen loss* kulit hingga saat ini masih belum jelas. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus galur wistar yang mengalami *collagen loss* akibat diinduksi sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* yang dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada

tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2 ml dalam sehari terhadap ekspresi gen TNF- α pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2 ml dalam sehari terhadap ekspresi gen MMP-1 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan topikal gel topikal ekstrak *Centella* dan air alkali secara oral dalam mencegah *collagen loss* akibat paparan sinar UVB pada kulit.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Ebau F, et al (2023) ²⁷	<i>Centella asiatica extract- SiO2 nanocomposite: More than a drug-delivery system for skin protection from oxidative damage</i>	<i>In vitro</i> dengan menggunakan sel keratinosit manusia	Nanokomposit SiO2 yang mengandung ekstrak <i>Centella asiatica</i> memiliki sifat struktural yang baik dan efek perlindungan terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif.
2	Sanguansajapong V, et al (2022) ²⁸	<i>Development of Oral Microemulsion Spray Containing Pentacyclic Triterpenes- Rich Centella Asiatica (L.) Urb.Extract For Healing Mouth Ulcers</i>	<i>In vitro</i> pada sel-sel fibroblas gingiva manusia	Ekstrak yang kaya akan pentacyclic triterpenes dari <i>Centella asiatica</i> menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam hal proliferasi sel dan aktivitas anti- inflamasi. Ekstrak ini berpotensi digunakan dalam formulasi semprotan oral.
3	Huang, et al. (2019) ²⁹	<i>Asiatic Acid Glucosamine Salt Alleviates Ultraviolet B-induced Photoaging of Human Dermal Fibroblasts and Nude Mouse Skin</i>	<i>In vitro and In vivo</i>	AAGS mengurangi dampak sinar UVB pada sel kulit dengan mengurangi penahanan fase G2 dan apoptosis, serta mengendalikan ekspresi gen terkait. Ini juga mengurangi radikal bebas dan peradangan, serta memperbaiki kolagen.
4	Khotimah, et al. (2021) ³⁰	<i>In silico studies of natural compounds of Centella Asiatica as anti-aging and wound healing agents</i>	<i>In Silico</i>	Senyawa obat efektif dari <i>Centella asiatica</i> L. yang dapat melawan protein penyebab penuaan dan penyembuhan luka.
5	Fernando Venesia, et.al (2022) ⁹	<i>Effectiveness Test of Centella Asiatica Extract on Improvement of Collagen an Hydration in female white rat (rattus norwegicus wistar)</i>	<i>In vivo</i>	Krim dengan konsentrasi ekstrak daun pegagan 10% menunjukkan peningkatan tingkat kolagen dan hidrasi tertinggi dibandingkan dengan krim lainnya.

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
6	Lee, et al. (2022) ²³	<i>Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults</i>	<i>In vivo</i>	Air alkali yang diberikan secara peroral terbukti memiliki kemampuan mengurangi stress oksidatif berlebihan dan mengatur pH kulit pada tikus model stress dan kelelahan.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa nanokomposit SiO₂ yang mengandung ekstrak *Centella asiatica* memiliki sifat struktural yang baik dan efek perlindungan terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif²⁷. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana pemberian topikal gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa ekstrak yang kaya akan *pentacyclic triterpenes* dari *Centella asiatica* menunjukkan hasil menginduksi proliferasi sel dan meningkatkan aktivitas anti- inflamasi. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana pemberian topikal gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1. Penelitian sebelumnya melaporkan *Asiatic Acid Glucosamine Salt* dari *Centella asiatica* mengurangi dampak sinar UVB pada sel kulit dengan mengurangi penahanan fase G2 dan apoptosis, serta mengendalikan ekspresi gen terkait. Ini juga mengurangi radikal bebas dan peradangan, serta memperbaiki

kolagen. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana pemberian topikal gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa senyawa obat efektif dari *Centella asiatica* L. dapat melawan protein penyebab penuaan dan penyembuhan luka. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1. Penemuan terdahulu juga melaporkan bahwa krim dengan konsentrasi ekstrak daun pegagan 10% menunjukkan peningkatan tingkat kolagen dan hidrasi tertinggi dibandingkan dengan krim lainnya. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana pemberian topikal gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa air alkali yang diberikan secara peroral terbukti memiliki kemampuan mengurangi stress oksidatif berlebihan dan mengatur pH kulit pada tikus model stress dan kelelahan.²³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana pemberian topikal gel ekstrak *Centella asiatica* yang dikombinasi dengan air alkali secara oral

akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Paparan kronik sinar *Ultraviolet B* (UV-B) menimbulkan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berdampak pada penurunan jumlah kolagen di kulit²⁻⁴. Peningkatan kadar NO dan ROS dapat menginduksi degradasi kolagen dengan menginduksi aktivasi faktor transkripsi NF- κ B sehingga menginduksi pelepasan enzim MMPs untuk mendegradasi kolagen^{31,32}. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang diinduksi oleh UVB mengarah pada aktivasi MAPK termasuk ERKs, *C-Jun N-terminal Kinases* (JNKs), dan p38 kinases. Kinase ini memfosforilasi faktor transkripsi seperti c-Jun dan c-Fos, yang merupakan komponen dari kompleks *Activator Protein 1* (AP-1)^{33,34}. *Activator Protein 1* (AP-1) kemudian meningkatkan ekspresi MMPs yang merupakan enzim yang mendegradasi kolagen dan komponen lain dari matriks ekstraseluler. *Matrix MetalloProteinase* (MMPs) bertanggung jawab untuk degradasi dan remodeling ECM. Paparan UVB merangsang produksi MMPs, terutama MMP-1, yang secara spesifik memecah serat kolagen, menyebabkan kehilangan kolagen dan penuaan kulit.^{14,35}

2.1. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)

2.1.1. Definisi TNF- α

Istilah *Tumor Necrosis Factor* diberikan pada dua molekul, yaitu *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α), yang merupakan faktor nekrosis yang berasal dari monosit, dan *Tumor Necrosis Factor Beta* (TNF- β), yang merupakan faktor nekrosis yang berasal

dari limfosit³⁶ TNF- α utamanya diproduksi oleh fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan oleh antigen, sel natural killer, dan sel mast, tetapi sumber utama TNF- α di paru-paru adalah makrofag alveolar. Stimulasi utama bagi makrofag untuk mengeluarkan TNF- α adalah lipopolisakarida dan IFN- γ ³⁷.

2.1.2. Peran TNF- α pada *Collagen Loss*

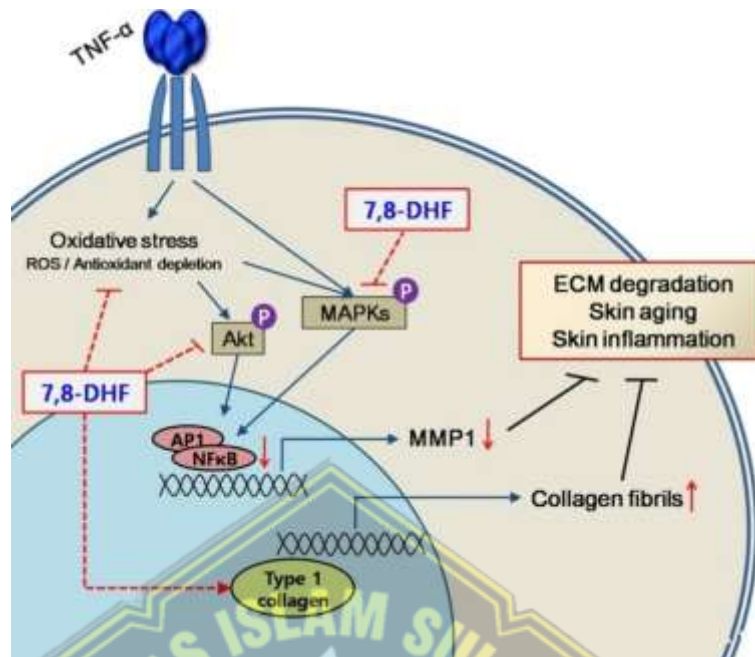
Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) berperan sebagai mediator inflamasi bersama dengan stimulus dan sitokin lainnya seperti IL-1 β dan IL-6 melalui interaksinya dengan Toll Like Receptors (TLRs), reseptor IL-1, reseptor IL-6, dan reseptor TNF. Aktivasi dari reseptor ini dapat memicu jalur sinyal intraseluler, termasuk *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), *Nuclear Factor Kappa- β* (NF- $\kappa\beta$), dan *Janus Kinase* (JAK)-*Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), yang mengatur produksi sitokin-sitokin proinflamasi, kemokin, dan rekrutmen sel-sel imun menuju lokasi peradangan³⁸.

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) memiliki beragam peran dalam proses inflamasi. Salah satunya adalah kemampuannya untuk meningkatkan peran protrombotik dan merangsang sel leukosit untuk mengeluarkan molekul adhesi. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) juga mengatur aktivitas makrofag dan sistem kekebalan tubuh di jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan

dan sitokin lainnya. Selain itu, TNF- α berperan dalam respon imun terhadap virus, jamur, bakteri, dan parasit³⁷.

Selain terlibat secara langsung dalam proses inflamasi, TNF- α juga memiliki kemampuan untuk memicu produksi ROS melalui mitokondria sel endotel dan NAD(P)H pada membran plasma. Efek sitotoksik TNF- α terhadap mitokondria sel endotel disampaikan melalui perubahan fungsi mitokondria yang kemudian memicu produksi ROS di mitokondria, terutama di situs ubiquinone, dan merusak rantai mitokondria di kompleks III. Akibatnya, terjadi peningkatan produksi ROS di dalam mitokondria³⁸. Mekanisme pembentukan degradasi kolagen akibat TNF- α dapat dilihat pada diagram di bawah ini (Gambar 2.1)³⁹.

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) memiliki kemampuan untuk menginduksi kematian sel melalui pengikatannya dengan TNF receptor 1 (TNFR1) dan TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) serta TRAIL receptor 2, yang melibatkan serangkaian kaskade intraselular. Namun, meskipun demikian, TNF- α tidak selalu berhasil memicu apoptosis pada semua jenis sel karena terdapat dua mekanisme pertahanan sel di dalamnya yang melindungi sel dari kematian sel⁴⁰.



Gambar 2.1. Mekanisme degradasi kolagen akibat TNF- α ⁴⁰

2.2. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)

2.2.1. Definisi MMP-1

Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) adalah kolagenase interstisial dan kolagenase fibroblas adalah enzim yang pada manusia dikodekan oleh gen MMP1. Gen tersebut merupakan bagian dari sekelompok gen MMP yang terlokalisasi pada kromosom 11q22.3. *Matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) adalah kolagenase vertebrata pertama yang dimurnikan untuk homogenitas sebagai protein, dan dikloning sebagai cDNA. *Matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) memiliki perkiraan berat molekul 54⁷.

2.2.2. Peran MMP-1 pada Degradasi Kolagen

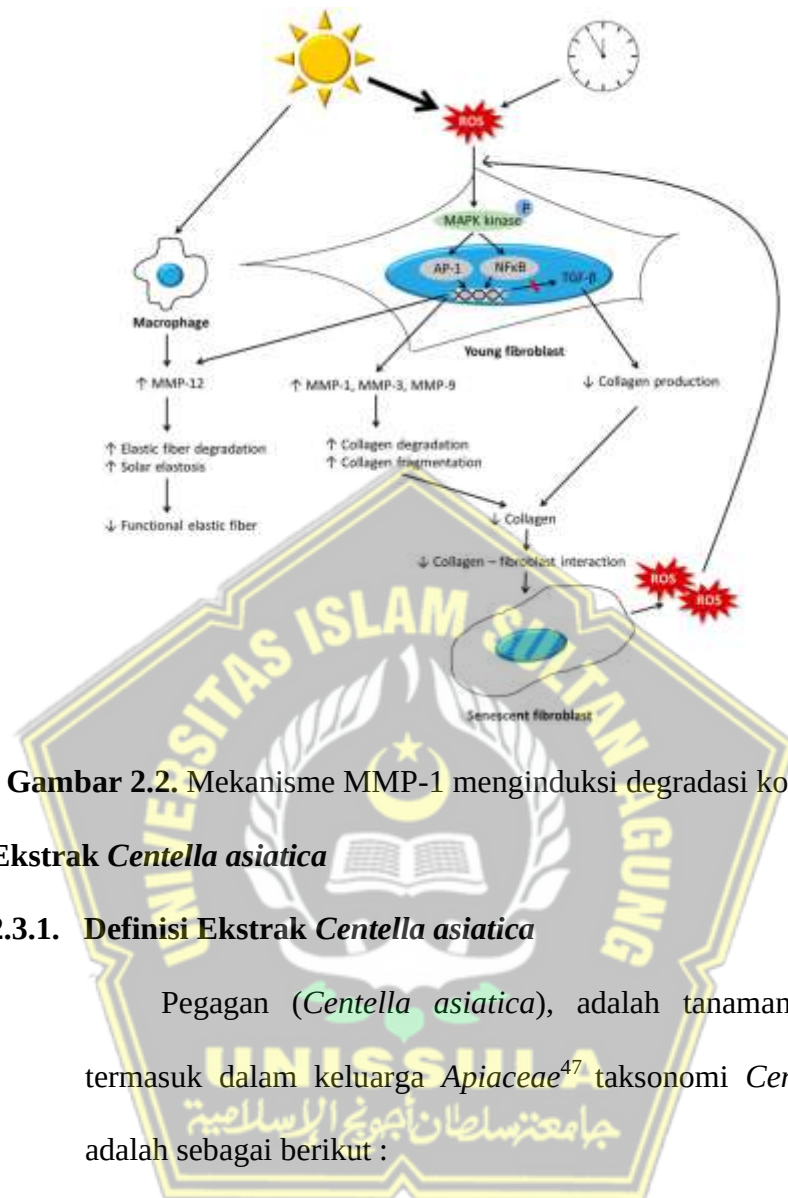
Ekspresi MMP-1 meningkat ketika sistem menghadapi gangguan, seperti proses penyembuhan luka, perbaikan, atau

remodeling seperti yang terjadi pada beberapa kondisi patologis. Ekspresi kolagenase-1 diatur secara transkripsi oleh faktor pertumbuhan, hormon, dan sitokin, dan aktivitas proteolitik diUVB secara akurat melalui aktivator dan inhibitor seperti -makroglobulin, dan penghambat jaringan metaloproteinase (TIMPs)⁴¹. Aktivasi pro-enzim terjadi ketika hubungan sistein yang tidak berpasangan, dalam domain pro urutan PRCGXPD, membentuk jembatan dengan seng katalitik secara kimiawi terganggu seperti misalnya, oleh asam amino fenil merkuri (APMA). Relevansi biologis adalah aktivasi pro-MMP-1 oleh pembelahan proteolitik prodomain yang tampaknya terjadi di secara bertahap membutuhkan setidaknya dua proteinase untuk aktivasi penuh, interaksi urokinase aktivator plasminogen dan stromelysin-1¹.

Beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan menginduksi transkripsi MMP-1. Promotornya mengandung TATA kotak di sekitar 30 bp, dan situs AP-1 di sekitar 70 bp. AP-1 mengikat heterodimer Fos-Jun atau homodimer Jun-Jun. Situs AP-1 tambahan adalah ditemukan pada 186 bp yang memiliki peran sederhana dalam basal transkripsi tetapi bertanggung jawab atas peningkatan transkripsi sebagai respons terhadap ester phorbol^{6,42}. Situs AP-1 bekerja sama dengan berbagai urutan cis-acting, dan khususnya, situs Ap1 pada 1602 bp menarik karena bekerja sama dengan situs Ets yang dibuat oleh polimorfisme nukleotida tunggal

pada 1607 bp. Polimorfisme ini diwakili dengan penyisipan basa guanin ekstra yang menciptakan situs pengikatan untuk faktor transkripsi Ets untuk ditingkatkan ekspresi MMP-1. Menariknya, pasien dengan beberapa jenis kanker menunjukkan frekuensi yang lebih tinggi dari dua alel guanin dibandingkan dengan individu yang tidak terpengaruh^{43,44}.

Penginduksi sitokin MMP-1 termasuk epidermal faktor pertumbuhan, *fibroblast growth factor* (FGF)-1, -2, -7, dan -9, faktor pertumbuhan hepatosit, faktor perangsang koloni makrofag granulosit, interferon beta dan gamma, faktor pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit, *transforming growth factor alpha* (TGF- α), dan interleukin (IL)-1, -4, -5, -6, -8, dan -10. Pada di sisi lain, TGF dan turunan vitamin A dan asam retinoat all-trans dan retinoid sintetis menekan transkripsi MMP-1. *transforming growth factor alpha* (TGF- α) menengahi nya melalui elemen penghambat TGF (TIE). Mutasi pada elemen ini menghasilkan peningkatan yang signifikan antigen polipeptida basal dan jaringan (TPA) menginduksi transkripsi gen MMP-1 dalam fibroblast menunjukkan bahwa TIE mungkin memiliki peran sebagai MMP-1 penekan konstitutif dalam sel-sel ini^{45,46}.



Gambar 2.2. Mekanisme MMP-1 menginduksi degradasi kolagen⁴⁶

2.3. Ekstrak *Centella asiatica*

2.3.1. Definisi Ekstrak *Centella asiatica*

Pegagan (*Centella asiatica*), adalah tanaman tropis yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae*⁴⁷ taksonomi *Centella asiatica* adalah sebagai berikut :

1. Kingdom : Eukaryota
2. Subkingdom : Embryophyta
3. Division : Spermatophyta
4. Subdivision : Angiospermae
5. Class : Dicotyledoneae
6. Subclass : Rosidae
7. Superorder : Araliaanae

- 8. *Order* : *Araliales (Umbelliflorae)*
- 9. *Family* : *Apiaceae atau Umbelliferae*
- 10. *Subfamily* : *Hydrocotyle*
- 11. *Genus* : *Centella*
- 12. *Species* : *Centella asiatica*⁴⁸



Gambar 2.3. Daun Pegagan⁴⁹

2.3.2. Peran Ekstrak *Centella asiatica* sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi

Tanaman ini mengandung berbagai senyawa aktif seperti asam *asiatic*, *madecassic acid*, *asiaticoside*, *madecassoside*, *brahmoside*, *brahmic acid*, *brahminoside*, *thankinaside*, *isothankunisode*, *centelloside*, *madasiatic acid*, *centic acid*, dan *cenellicacid*. Senyawa-senyawa ini berkontribusi pada berbagai sifat terapeutik dari tanaman ini, termasuk aktivitas antioksidan, antimikroba, dan sitotoksik⁵⁰ Salah satunya yaitu *Flavonoid*, *Flavonoid* merupakan kelompok terbesar dari senyawa *fenolik* yang terjadi secara alami, yang terdapat di berbagai bagian tanaman baik dalam keadaan bebas

maupun sebagai glikosida. *Centella Asiatica* mengandung tingkat flavonoid yang tinggi. *Flavonoid* ini berperan penting sebagai antioksidan yang dapat membantu melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas⁵¹ *Flavonoid* berperan penting dalam aktivitas antioksidan diukur melalui nilai IC50 dari ekstrak *Centella asiatica*. Selain bersifat antioksidan, dalam penelitian yang dilakukan oleh Kandasamy et al., *Flavonoid* juga diketahui berperan sebagai antiinflamasi⁴⁷.

Salah satu jenis *flavonoid*, yaitu *quercetin* dapat menghambat jalur *siklooksigenase* dan *lipoksigenase* pada metabolisme *asam arakidonat* sehingga menyebabkan terganggunya sintesis *prostaglandin* dan *leukotrien*. Jalur *siklooksigenase* dan *lipoksigenase* yang terhambat, menyebabkan produksi *prostaglandin* dan *leukotrien* berkurang. Berkurangnya *prostaglandin* sebagai mediator inflamasi dapat menyebabkan nyeri dan pembengkakan berkurang, serta mengurangi terjadinya vasodilatasi pembuluh darah dalam aliran darah lokal sehingga migrasi sel radang akan menurun dan *sunburn* dihambat. Cara kerja Pegagan sebagai anti inflamasi melalui senyawa aktifnya *flavonoid*. *Flavonoid* yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan dinilai lebih tinggi dibanding tanaman obat lainnya dan berpotensi untuk melindungi dari sinar matahari, potensi tersebut disebabkan karena adanya gugus kromofor sistem aromatik terkonjugasi yang dapat menyerap sinar UV A dan UV B.

Flavonol kuersetin bereaksi dengan radikal bebas, *kuersetin* mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal, tapi elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokalisasi oleh resonansi, hal ini membuat senyawa *kuersetin* radikal memiliki energi yang sangat rendah untuk menjadi radikal yang reaktif. Tiga gugus dari struktur *kuersetin* yang membantu dalam menjaga kestabilan dan bertindak sebagai antioksidan ketika bereaksi dengan radikal bebas antara lain:

1. Gugus O-dihidroksil pada cincin B
2. Gugus 4-oxo dalam konjugasi dengan alkena 2,3
3. Gugus 3-dan 5- hidroksil

Gugus fungsi tersebut dapat mendonorkan elektron kepada cincin yang akan meningkatkan jumlah resonansi dari struktur benzene senyawa *kuercetin*. *Ekstrak etanol* pegagan dapat meningkatkan sintesis kolagen tiga kali lipat dari sel fibroblas manusia dibandingkan dengan kontrol. Sintesis kolagen tertinggi ditemukan pada ekstrak pegagan yaitu 50 mg/mL. Ekstrak ini menunjukkan aktivitas pembersihan radikal DPPH yang signifikan dengan penghambatan 84% pada konsentrasi 1 mg/mL. Aktivitas tersebut dibandingkan dengan ekstrak biji anggur dan vitamin C .

Asam caffeoylquinic adalah kelompok senyawa aktif penting kedua di *C. asiatica* , dengan potensi meningkatkan jalur respons antioksidan *Nrf2*. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)* adalah faktor transkripsi yang mengatur jalur respons antioksidan

endogen. Jalur respons antioksidan endogen melindungi sel dari stres oksidatif dengan meningkatkan transkripsi gen sitoprotektif melalui pengikatan faktor transkripsi faktor transkripsi *Nrf2* ke elemen respons antioksidan (AREs) pada promotor gen antioksidan. Pegagan juga mengandung *Triterpenoid ursane* dapat menekan produksi *nitrit oksida* (NO) dan sekresi *TNF- α* di lipopolisakarida yang merangsang sel RAW 264, sehingga senyawa *asiatikosida* memiliki efek anti inflamasi pada pegagan.



Gambar 2.4. Struktur Kimia *Flavonoid* dan jenis-jenisnya⁵²

2.4. Air Alkali

2.4.1. Definisi Air Alkali

Air alkali, juga dikenal sebagai air terionisasi atau air elektrolisis, adalah air yang memiliki pH lebih tinggi dari air minum biasa, biasanya berkisar antara 8,5 hingga 11,5⁵³. Air ini diproduksi melalui proses elektrolisis yang memisahkan molekul asam dan basa dalam air, kemudian membuang kandungan asamnya. Beberapa karakteristik air alkali meliputi:

1. pH basa (8-10)
2. Nilai *oxidation-reduction potential* (ORP) yang sangat rendah (negatif)
3. Kandungan hidrogen terlarut yang tinggi

2.4.2. Peran Air Alkali dalam Mencegah Degradasi Kolagen

Air alkali telah menjadi populer karena klaim manfaat kesehatannya, termasuk potensinya dalam menjaga kesehatan kulit. Beberapa manfaat yang diklaim terkait dengan perawatan kulit dan pencegahan degradasi kolagen antara lain:

1. Melembabkan kulit: Air alkali dapat membantu melembabkan dan menyehatkan kulit. Kulit yang terhidrasi dengan baik cenderung lebih elastis dan tahan terhadap kerusakan.
2. Efek antioksidan: Air alkali mengandung molekul hidrogen terlarut (H₂) yang tinggi, yang berpotensi bertindak sebagai antioksidan. Antioksidan dapat membantu melindungi kulit dari kerusakan akibat radikal bebas, yang dapat mempercepat degradasi kolagen.
3. Meningkatkan sirkulasi: Air alkali diduga dapat meningkatkan sirkulasi darah. Sirkulasi yang baik penting untuk membawa nutrisi ke kulit dan membuang toksin, yang dapat membantu menjaga kesehatan kolagen.
4. Menetralkan racun: Ion negatif dalam air alkali dapat membantu menetralkan racun dalam tubuh. Hal ini potensial untuk

mengurangi stres oksidatif pada kulit, yang dapat berkontribusi pada degradasi kolagen.

5. Meningkatkan penyerapan oksigen: Ion negatif dalam air alkali dilaporkan dapat mempercepat pengiriman oksigen ke sel dan jaringan. Oksigenasi yang baik penting untuk kesehatan kulit dan produksi kolagen^{23,25,26}.

2.5. Kolagen

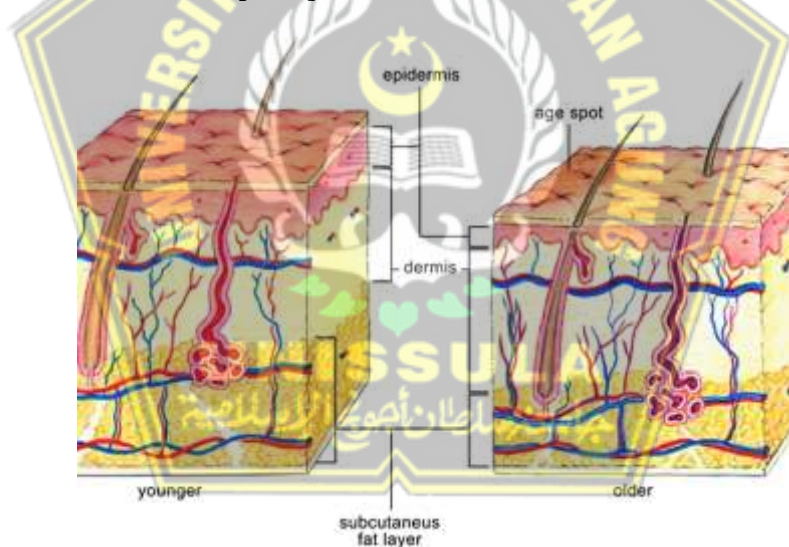
2.5.1. Definisi

Kolagen Merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen, jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia⁵⁴.

Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada

kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah ⁵⁵.

Telah banyak dibuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas ⁵⁴. Karena kolagen-1 yang mendominasi organ kulit, maka kolagen-1 yang akan diukur pada penelitian kali ini.



Gambar 2.5. Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah Kolagen pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua ⁵⁶.

Pada umumnya jumlah kolagen akan berkurang dengan bertambah umur. Akan tetapi beberapa tipe kolagen mengalami hal yang tidak sama. Pada kulit anak mempunyai banyak kolagen-3 (biasanya pada jaringan dengan pertumbuhan cepat). Pada proses

penuaan intrinsik akan terjadi penurunan kolagen-3 dan peningkatan kolagen-1. Kolagen-1 terus meningkat sampai umur 35 tahun, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu kolagen-1 akan menurun. Hubungan umur dengan jumlah kolagen sampai saat ini belum jelas, akan tetapi jumlah kolagen manusia setelah umur 60 tahun secara keseluruhan secara signifikan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kulit umur lebih muda ⁵⁵.

Kolagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Semakin bertambah umur maka struktur protein kulit dan komponen kulit lain akan berubah dan hal ini menyebabkan penuaan kulit. Perubahan jumlah kolagen merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Diperkirakan bahwa akan terjadi penurunan kolagen sekitar 1% pertahun perunit area kulit akan tetapi pada kulit yang terpapar sinar UVB dijumpai penurunan sampai 59% seperti yang ditemukan pada kulit yang mengalami *photodamage* ⁵⁴.

Walaupun kolagen-1 merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi kolagen tipe lain juga tidak kalah peranan pentingnya. Kolagen-7 yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan paparan sinar UVB kronis akan menurunkan jumlah kolagen-7 dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga

ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa kerutan kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan kolagen-7 pada pada dasar kerutan kulit di samping juga ditemukan penurunan kolagen-4 pada tempat yang sama⁵⁷.

2.5.2. Mekanisme Kerusakan Kolagen

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast yang menunjukkan bahwa paparan pada kultur fibroblast kulit yang mengalami kerusakan akibat Ultraviolet. Pada kulit yang terlindungi sinar matahari dengan kolagen Tipe I yang terdegradasi sebagian diperoleh melalui percobaan *in-vitro* kolagen yang dicampur dengan MMPs yang diinduksi oleh sinar Ultraviolet, yang terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu; mekanisme secara langsung terjadi degradasi kolagen secara tidak langsung melalui hambatan sintesis kolagen oleh degradasi kolagen yang terbentuk dari MMP. Kolagen Tipe I yang terfragmentasi memberikan umpan balik negatif terhadap sintesisnya⁵⁸. Model yang menggambarkan kerusakan akibat paparan sinar UVB pada jaringan kulit. Paparan ultraviolet (panah bergerigi) mengaktifkan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin pada permukaan keratinosit dan fibroblast. Reseptor aktif menstimulasi jalur sinyal transduksi dan merangsang faktor transkripsi AP-1, yang mempengaruhi transkripsi gen MMP. Dalam

fibroblas, AP-1 juga menghambat ekspresi gen prokolagen. MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dan memecah kolagen dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraselular dermis. Perbaikan kerusakan kulit yang tidak sempurna akan mengganggu integritas fungsional dan struktural dari matriks ekstraseluler. Paparan sinar matahari berulang menyebabkan akumulasi kerusakan kolagen yang akhirnya menghasilkan kerutan yang spesifik (*photodamage skin*)^{59,60}.

2.5.3. Sintesis Kolagen

Awal polipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai prokolagen α , dimana terjalin dalam sistena retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam kolagen dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁶¹.

Bentuk *triple helix* dari rantai α berbetnuk molekul prokolagen seperti sebuah batang, dimana kolagen tipe 1 dan 2 berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul prokolagen mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai prokolagen α sangat bertanggungjawab atas bermacam-macam tipe dari kolagen dengan

struktur dan fungsi yang berbeda. Pada kolagen tipe I, II, III, molekul kolagen bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril⁶².

Karena kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini, yaitu⁶³:

1. Lipetida rantai prokolagen α diproduksi pada ikatan poliribosom yang berikatan dengan membrane dari Retikulum Endoplasma yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum tertentu dan masih terikat pada ribosom. Enzim yang menyertai adalah prolil hidroksilase dan lisil hidroksilase dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai kofaktor.
3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari kolagen yang memiliki jumlah ikatan galaktosa-hidroksilisin yang berbeda-beda.
4. Gugus amino dan karboksil akhir dari setiap rantai α membentuk polipeptida non helix, kadang disebut propeptida ekstensi, dimana membantu rantai α (α_1 , α_2) membentuk dengan posisi yang benar menjadi *triplehelix*. Sebagai tambahan, propeptida nonhelix membuat molekul prokolagen soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan

pengendapan dari fibril kolagen. Prokolagen ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.

5. Diluar sel, protease spesifik disebut peptidase prokolagen menyingkirkan perpanjangan propeptida, perubahan dari molekul prokolagen menjadi molekul kolagen. Sekarang ini sesuai untuk pembentukan sendiri kedalam fibril kolagen polimerik, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.
6. Pada beberapa tipe kolagen, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe kolagen (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul kolagen untuk membentuk *fibril-fibril* dan formasi *fiber* yang berasal dari *fibril* dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen ekstraselular matrik lainnya.
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul kolagen, sebuah proses dikatalisis oleh enzim lisil oksidase.

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α prokolagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracelular Matrix* sesudah mengekskresikan prokolagen. Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α prokolagen dan

produksi kolagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa kolagen yang telah dijelaskan ⁶⁴.

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu α_1 dan α_2 . Massa 1 buah molecular kira-kira 100 kDa, terjalin helix pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan helix, dengan jarak 8,6 nm. Panjang setiap molekul tropokolagen adalah 300nm dan lebarnya 1,5 nm ⁶⁵.



Gambar 2.6. Mekanisme sintesis kolagen ⁶⁵

2.6. Efek Ekstrak *Centella asiatica* dan Air Alkali Terhadap Ekspresi Gen TNF- α dan MMP-1

Radiasi UVB berinteraksi langsung dengan DNA, membentuk lesi seperti *dimer pirimidin siklobutana* (CPDs) dan produk fotopirimidin 6-4 (6-4PPs). Lesi ini mengganggu proses replikasi dan transkripsi DNA normal, yang mengarah pada disfungsi sel dan apoptosis yang menyebabkan

peningkatan stress oksidatif⁶⁶. Peningkatan produksi ROS, yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, protein, dan lipid. Stres oksidatif ini memperburuk kerusakan DNA dan dapat menyebabkan disfungsi mitokondria. *Reactive Oxygen Species* (ROS) juga mengaktifkan MMP, yang mendegradasi kolagen dan berkontribusi pada penuaan kulit dan hilangnya integritas dermal. Aktivasi ROS menginduksi ekspresi faktor transkripsi NF- κ B yang akan mengaktifkan enzim MMPs melalui MAPK dan AP-1 sehingga terjadi degradasi kolagen⁶⁷.

Ekstrak *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Potensi antioksidan ekstrak *Centella asiatica* dapat menekan kadar ROS. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* dapat menurunkan regulasi produksi TNF- α ¹⁹. Ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% mempunyai aktivitas anti inflamasi yang ditunjukkan penurunan aktivitas faktor inti kappa B pada sel dan penurunan produksi TNF- α , penurunan produksi IL-6 dan IFN- γ oleh makrofag^{68,69}. Penurunan regulasi sitokin proinflamasi seperti TNF- α oleh ekstrak *Centella asiatica* secara tidak langsung dapat berdampak pada ekspresi MMP-1²⁰. *Matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) adalah enzim pengatur degradasi kolagen dan ekspresinya dapat dipengaruhi oleh mediator inflamasi. Penggunaan senyawa antioksidan dapat mencegah aktivasi degradasi kolagen akibat sinar UVB⁷⁰.

Air alkali terbukti memiliki kemampuan mengurasi stress oksidatif berlebihan, mengatur pH kulit sehingga kolagen tetap stabil²³. Beberapa penelitian ilmiah telah menunjukkan potensi senyawa antioksidan dalam

menghambat aktivitas MMP-1 dan sitokin pro inflamasi sehingga berdampak pada penghambatan ECM mengalami degradasi, yang bertanggung jawab atas sintesis kolagen⁵. Selain itu, antioksidan juga dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan DNA oleh sinar UVB⁷¹. Paparan sinar matahari yang berlebihan dapat merusak DNA kulit, yang dapat menyebabkan penghambatan sintesis kolagen. Dalam hal ini, ekstrak *Centella asiatica* menghambat MMPs yang mencegah degradasi kolagen pada model sel kulit yang terradiasi UVB.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Collagen loss yang ditandai dengan hilangnya elastisitas kulit dan peningkatan degradasi kolagen disebabkan oleh paparan sinar UVB⁷². Mekanisme *collagen loss* pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan kerusakan sel keratinosit sehingga terjadi pembentukan ROS dan degradasi DNA⁷³. Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet (1O_2), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($OH^\cdot$) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)⁷⁴. *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) adalah keluarga dari kinase Ser/Thr yang diarahkan oleh prolin yang terdiri dari *Extracellular Signal-Regulated Kinases* (ERKs) yang menstimulasi ekspresi AP-1^{75,76}. Aktivasi AP-1 akan mengaktifkan pelepasan enzim MMP-1 sehingga menyebabkan degradasi kolagen^{77,78}. Kerusakan DNA menstimulasi IKK kinase yang memfosforilasi I κ B, menyebabkan NF- κ B bertranslokasi ke dalam nukleus. Translokasi NF- κ B ke nukleus ini menginduksi aktivasi faktor transkripsi berbagai sitokin pro-inflammasi seperti TNF- α dan mengakibatkan berhentinya sintesis kolagen⁷⁹.

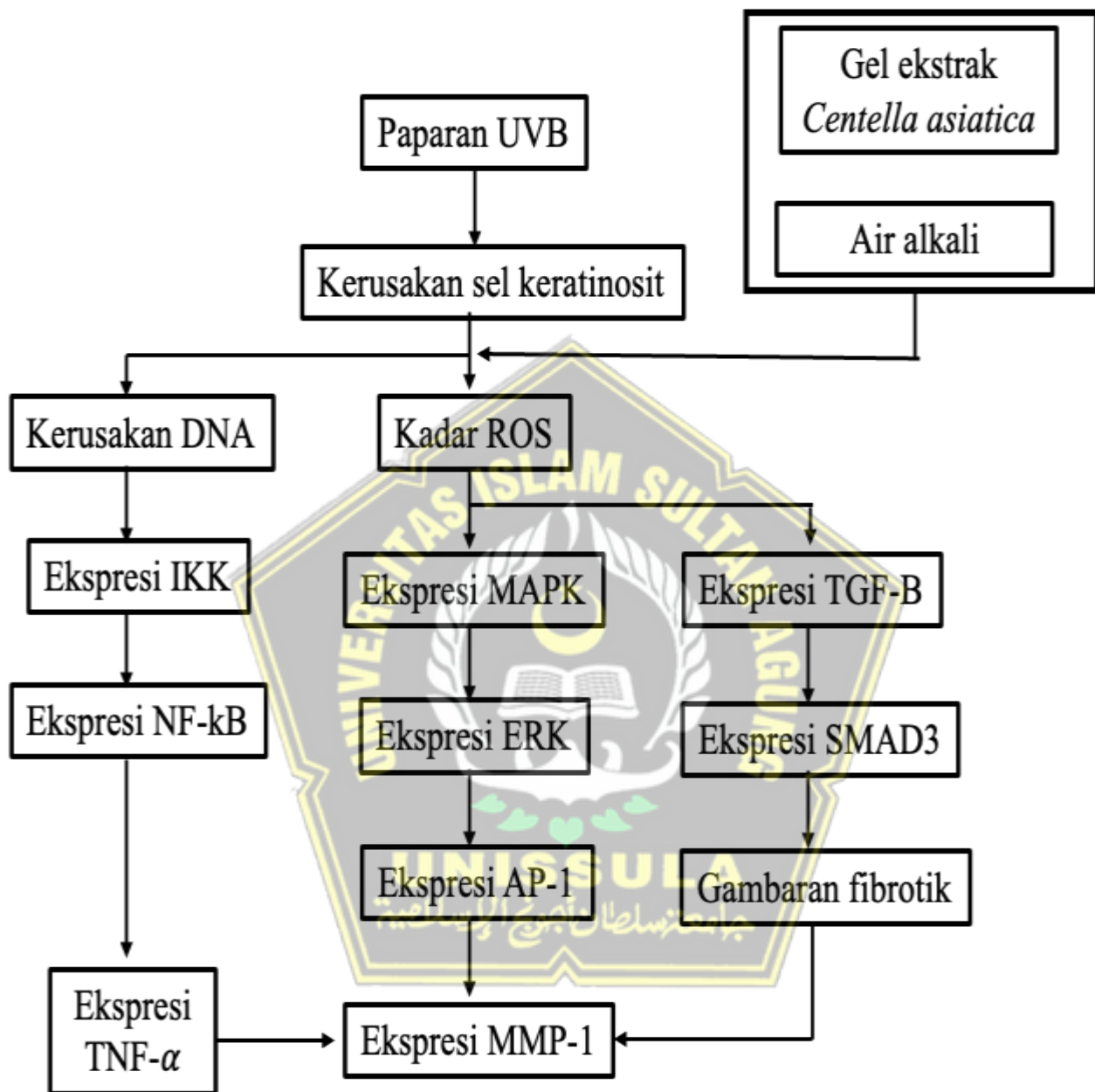
Respons terhadap kerusakan keratinosit, sel-sel dapat meningkatkan ekspresi berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β , untuk memediasi perbaikan dan regenerasi jaringan, serta untuk mengurangi

inflamasi⁵⁸. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) dapat berfungsi sebagai agen anti-inflamasi maupun pro-inflamasi tergantung pada kondisi lingkungan sel⁴. Selama paparan UVB, TGF- β yang berasal dari keratinosit menginduksi foto-inflamasi melalui MMP-1 dan perekrutan neutrofil. Sementara itu, fibroblas di dermis mengaktifkan TGF- β /Smad3 yang memberi sinyal untuk menginduksi respons fibrotik, menyebabkan kerusakan pada fibril kolagen dan pembentukan elastosis surya³².

Centella asiatica memiliki berbagai komponen bioaktif yang dapat berfungsi dalam mencegah inflamasi kulit. Salah satu komponen utamanya adalah triterpenoid yang memiliki aktivitas anti-inflamasi dan asiaticoside sebagai antioksidan²¹. Senyawa flavonoid yang terkandung juga dalam ekstrak *Centella asiatica* dengan mentransfer elektron secara langsung kepada radikal untuk membentuk spesies kurang reaktif. Aktivasi Nrf2 akan bertranslokasi ke nucleus sehingga dapat menginduksi pelepasan enzim-enzim antioksidan dan menekan produksi ROS^{31,80}. Senyawa ekstrak *Centella asiatica* juga menghambat ekspresi STAT3 sehingga menghambat aktivasi NF- κ B yang dapat menekan pelepasan sitokin pro-inflammasi dan melanogenesis^{81,82}. Air alkali memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi berdasarkan penelitian terdahulu pada pasien penyakit kanker^{25,26,53} meskipun beberapa penelitian menunjukkan potensi ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali secara *independent* dalam mencegah inflamasi kulit, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme tepat pada kombinasi topikal gel ekstrak *Centella asiatica* dan

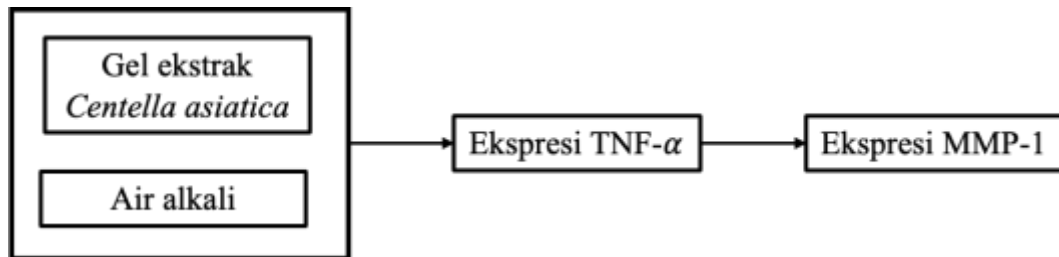
air alkali secara oral di balik efek ini antiinflamasi dan antioksidan, untuk menentukan dosis yang paling efektif pada kondisi *collagen loss*.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

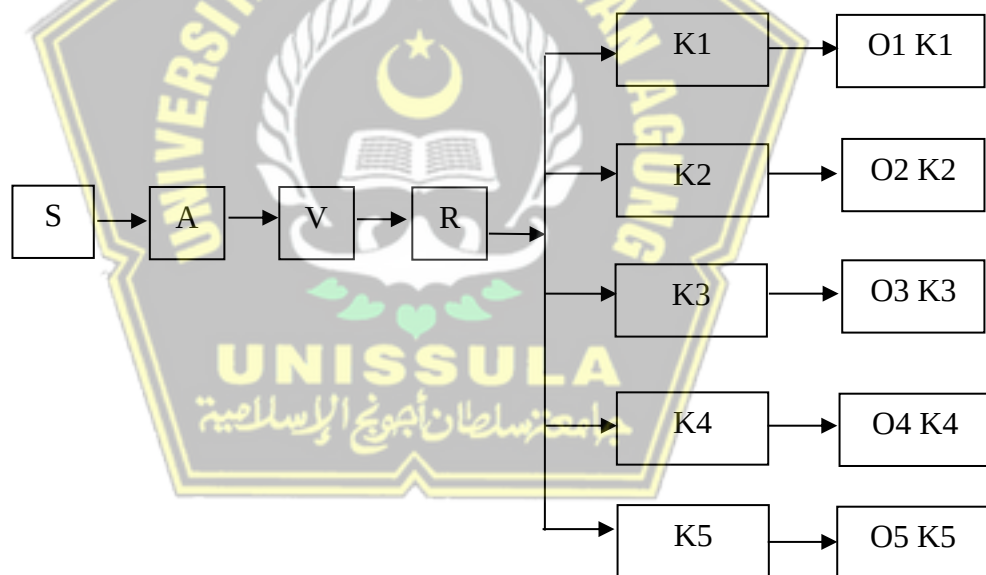


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 3 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang hanya dengan paparan UVB (kontrol negatif) dan 1 kelompok dengan HA (kontrol positif). Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1 : Kontrol Negatif, tikus dengan paparan UVB

- Perlakuan : K2: Kontrol positif, tikus dengan paparan UVB dengan diberikan gel *Hyaluronic acid* (HA).
- Perlakuan : K3: Tikus dengan paparan UVB dengan diberi gel ekstrak *Centella asiatica* dosis 10%.
- Perlakuan : K4: Tikus dengan paparan UVB dengan air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari.
- Perlakuan : K5: Tikus dengan paparan UVB dengan diberi gel ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% yang dikombinasi dengan air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari.
- O1K1 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 K1
- O2K2 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 K2
- O3K3 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 K3
- O4K4 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 K4
- O5K5 : Observasi ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Gel ekstrak *centella asiatica* dosis 10% secara topikal yang dikombinasi dengan air alkali yang diberikan secara oral.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen TNF- α dan MMP-1

4.2.1.3. Variabel Prekondisi

Paparan sinar UVB

4.2.1.1. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah strain tikus wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan

tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Defenisi Operasional

4.2.2.1. Ekstrak *Centella asiatica*

Ekstrak *Centella asiatica* adalah ekstrak kental etanol dari daun *Centella asiatica* kering yang diproduksi dengan metode maserasi selama 72 jam dan di evaporasi dengan menggunakan rotary vacuum evaporator. Ekstrak *Centella asiatica* diberikan selama 14 hari secara topikal dalam bentuk sediaan gel dengan dosis 10%. Tanaman *Centella asiatica* berasal dari RSUP dr. Sarjito TawangMangu dengan kriteria daun berusia 3 bulan dan tidak terdapat bintil putih atau jamur. Pembuatan gel ekstrak *Centella asiatica* dilakukan di Lab SCCR Semarang.

Satuan: gram

Skala: nominal

4.2.2.2. Air Alkali

Air alkali adalah air yang memiliki pH lebih dari 8 yang di buat dengan cara menghilangkan kandungan asam didalamnya yang diproduksi oleh PT. *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia. Air alkali diberikan sebanyak tiga kali 2 ml per hari secara oral.

Satuan: mL

Skala: nominal

4.2.2.3. Ekspresi gen TNF- α

Ekspresi gen TNF- α adalah rasio ekspresi gen protein sitokin proinflammasi yang diproduksi oleh sel-sel kulit, termasuk keratinosit dan sel Langerhans, sebagai respons terhadap paparan UVB akut. TNF- α pada penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan kulit tikus yang diambil pada hari ke 15. Ekspresi gen TNF- α dianalisis dengan qRT-PCR yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH.

Satuan: Rasio mRNA level TNF- α /GAPDH

Skala: rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen MMP-1

Ekspresi gen MMP-1 adalah ekspresi gen suatu enzim yang berperan dalam proses degradasi kolagen kulit sebagai respon terhadap sinar UVB. MMP-1 pada penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan kulit tikus yang diambil pada hari ke 15. Ekspresi gen MMP-1 dianalisis dengan qRT-PCR yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH.

Satuan: Rasio mRNA level MMP-1 /GAPDH

Skala: rasio

4.2.2.5. Sinar UVB

Dalam penelitian ini, sinar UVB merujuk kepada radiasi UVB yang dihasilkan oleh perangkat UVB

narrowband tipe TLF72-100W/12. Dosis paparan sinar UVB dengan 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 minggu⁸³.

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. 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 minggu⁸³ hingga berkurangnya densitas kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Kondisi sehat.
2. Tikus belum pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

1. Tikus sakit selama penelitian yang terlihat dengan aktivitas tikus melemah

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tikus model *collagen loss* yang dipapar UVB dan tidak diberi perlakuan), kelompok kontrol positif (tikus model *collagen loss* dipapar UVB dan diberi gel *hyaluronic acid*), kelompok perlakuan 1 (tikus model *collagen loss* dipapar UVB dan diberi gel ekstrak *Centella asiatica* secara topikal dosis 10%), kelompok perlakuan 2 (tikus model *collagen loss* dipapar UVB dan diberi air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari), dan kelompok perlakuan 3 (tikus model *collagen loss* dipapar UVB dan diberi gel ekstrak *Centella asiatica* secara topikal dosis 10% dan dikombinasi dengan air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari).

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

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

$$\text{Sampel tiap Kelompok} : (5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 4.75 \text{ (pembulatan 5)}$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 6 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 6 ekor tikus perkelompok.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain berupa UV light (broadband dengan puncak emisi 302 nm) dengan energi 160 mJ/cm², pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL micropipet tip, dan vial tube 1,5 mL.

Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain microplate reader, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk perlakuan seperti ekstrak *Centella asiatica*, basis gel, air alkali, ketamin, xylazine, etanol, akuades, pakan tikus, chloroform, Sybr Green cDNA kit, trizole, primer TNF- α , primer MMP-1, dan primer GAPDH.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Komisi Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Pembuatan Ekstrak *Centella asiatica*

Daun kering *Centella asiatica* diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 hari menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:4 (g/v). Maserat selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan waterbath suhu 80°C selama 24 jam untuk memperoleh ekstrak kental.

4.5.3. Pembuatan Gel Ekstrak *Centella asiatica*

Sediaan gel dibuat dengan cara carbophol dan HPMC dikembangkan dengan cara ditambahkan aquadest 70 °C dalam

gelaskimia, didiamkan hingga mengembang selama 1 x 24 jam. Kemudian TEA dicampurkan ke dalam basis lalu dihomogenkan. Kedua massa tersebut dicampurkan ke dalam lumpang sambil diaduk homogen, ditambahkan metil paraben yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquadest panas suhu 90 °C dihomogenkan. Dicampurkan ekstrak etanol *Centella asiatica* ke dalam gliserin, lalu dimasukkan ke dalam basis sedikit demi sedikit, dihomogenkan. Kemudian sisa air ditambahkan setelah itu dihomogenkan dan didiamkan pada suhu ruangan hingga dingin.

Tabel 4.1. Komposisi Gel Ekstrak *Centella asiatica*⁸⁴

Bahan	Persentase
HPMC	2,25%
Carphopol	1,25%
TEA	1%
Gliserin	15%
Metil paraben	0,1%
Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	10%
Aqudest	Ad 100%

4.5.4. Model Collagen loss dengan Paparan UVB

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama tujuh hari dibius dengan dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian dorsal tikus potong hingga bersih dengan ukuran 5x5 cm.
3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (broadband dengan peakemission 302 nm) dengan dosis minimal erythema 160

mJ/cm²/hari yang dipapar sekitar sekitar 8 menit/hari dengan jarak 20cm selama 5 kali seminggu pada hari ke 1, 2, 4, 5, dan 7 selama 2 minggu⁸³ hingga berkurangnya densitas kolagen.

4. Pemberian gel ekstrak *Centella asiatica* dilakukan pada jam yang sama setiap hari yaitu jam 9 pagi dimulai pada hari ke-nol.
5. Selama masa perlakuan tikus selalu mendapatkan asupan air alkali sebanyak 3x2ml per hari pada kelompok K4 dan K5.
6. Tikus pada kelompok K3 dan K5 kemudian diberi perlakuan secara topikal menggunakan gel ekstrak *Centella asiatica* dengan dosis 10% sebanyak 100mg tiap tikus yang diberikan satu kali sehari selama 14 hari selama penyinaran UV-B.

4.5.5. Pengecekan Berkurangnya Kolagen Akibat UV-B Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan Masson Trichome⁸⁵ dengan tahapan sebagai berikut:

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.
3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.

5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
8. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
9. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.
10. Kolagen akan terwarnai biru, inti sel hitam, dan sitoplasma merah

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan kulit dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di bagian kulit yang terpapar UVB. Sampel jaringan dibagi menjadi dua dan dilakukan pemotongan dengan arah pemotongan jaringan vertikal, sehingga bisa didapatkan semua lapisan jaringan kemudian difiksasi dengan direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Dan dimasukkan didalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan

preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.7. Analisis Kuantitatif Ekspresi TNF- α dan MMP-1 menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁸⁶ Isolasi RNA jaringan kulit dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).
2. Penentuan ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.
3. Perhitungan ekspresi gen ekspresi gen TNF- α dan MMP-1 dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.

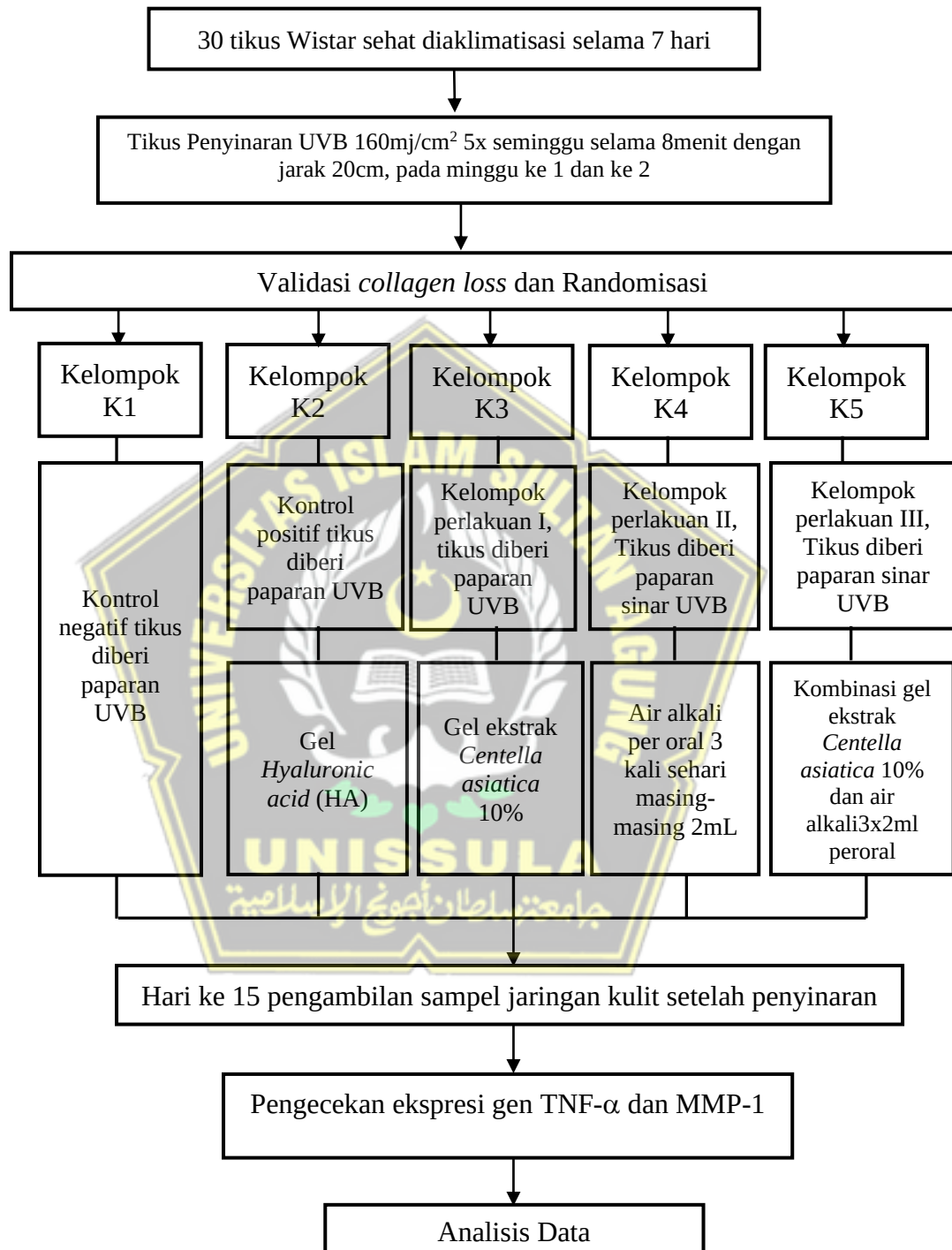
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR Semarang. Penelitian dilakukan pada November - Desember 2024.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Hasil rerata data pada penelitian ini didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Pada data $\text{TNF-}\alpha$ terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pada data MMP-1 dilakukan uji *Saphiro Wilk* dan berdistribusi normal ($p > 0.05$), dan dilanjutkan dengan *Levene's Test*, dengan hasil sebaran data normal dan tidak homogen. Lalu di lanjutkan pemeriksaan dengan *one-way ANOVA* dan terdapat nilai significant dengan nilai $p < 0.05$. Hasil yang significant kemudian dilanjutkan ke uji *Post Hoc Tamhane* dengan nilai signifikan $p < 0.05$. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

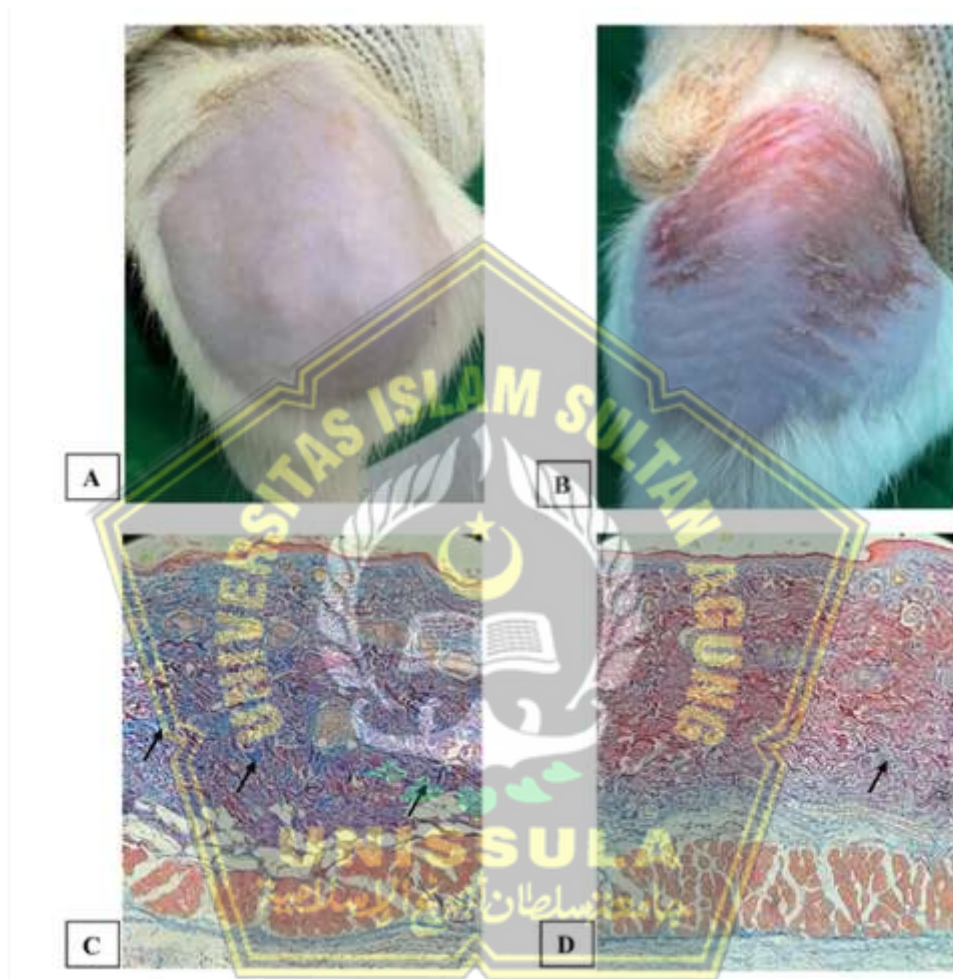
BAB V

HASIL 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 jantan *collagen loss* yang di induksi UVB 302 nm dengan dosis 160 mJ/cm² yang dipapar sekitar 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, sebelum penelitian dilaksanakan 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 menurunkan ekspresi gen TNF- α dan MMP-1.

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 Thrichrome* 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).

Ekstrak daun pegagan pada penelitian ini diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 8,09%. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun pegagan menunjukkan bahwa ekstrak daun

pegagan positif mengandung senyawa golongan alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin berdasarkan uji kualitatif. Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan total flavonoid dan fenolik dalam ekstrak daun pegagan dengan menggunakan metode spektrofotometri. Dalam 1gram ekstrak daun pegagan mengandung flavonoid sebesar $30,89 \text{ mg} \pm 0,98$ dan senyawa fenolik sebesar $60,55 \text{ mg} \pm 0,55$. Hasil ini membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang terkandung didalam ekstrak daun pegagan adalah golongan flavonoid. Pengujian antioksidan ekstrak daun pegagan terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air

Alkali terhadap ekspresi gen TNF- α

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali terhadap ekspresi gen TNF- α pada tikus galur wistar yang di induksi paparan sinar UVB dianalisis pada hari ke-29 (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Non Parametrik Kruskall Wallis pada Ekspresi Gen TNF- α

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Ekspresi gen TNF-α						
Mean	$7,96 \times 10^{-05}$	$8,73 \times 10^{-05}$	$2,64 \times 10^{-05}$	$8,23 \times 10^{-05}$	$3,57 \times 10^{-05}$	
Std.deviasi	0,00001	0,00008	0,00001	0,00007	0,00001	
Shapiro Wilk	0,389*	0,018	0,160*	0,013	0,169*	
Levene test						0,031
Kruskall Wallis						0,004***

Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$

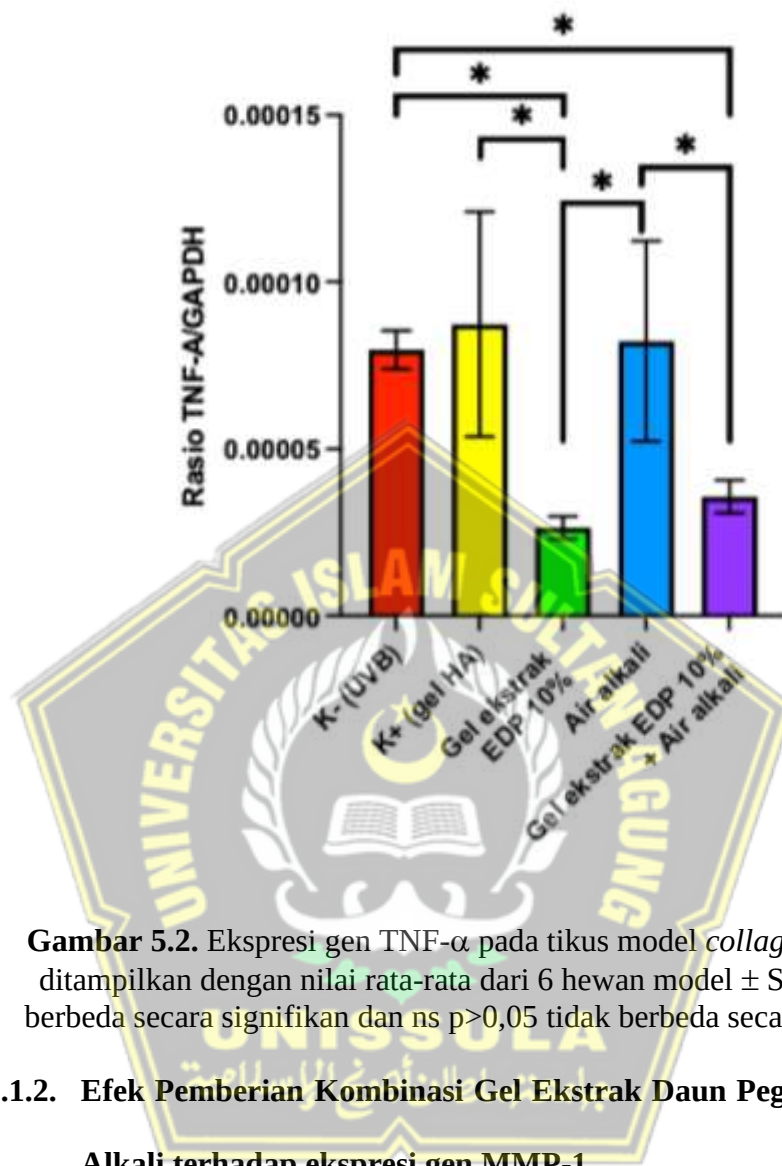
Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi gen TNF- α tertinggi pada kelompok kontrol positif HA sebesar $8,73 \times 10^{-05} \pm 0,00008$, diikuti kelompok kontrol negatif UVB sebesar $7,96 \times 10^{-05} \pm 0,00001$. Pada kelompok pemberian air alkali tunggal juga masih menunjukkan ekspresi gen TNF- α dan setara kontrol negatif UVB yaitu sebesar $8,23 \times 10^{-05} \pm 0,00007$. Pada kelompok pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% tunggal ($2,64 \times 10^{-05} \pm 0,00001$) dan pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dapat menurunkan ekspresi gen TNF- α hingga $3,57 \times 10^{-05} \pm 0,00001$. Rerata kadar TNF- α pada kelompok kontrol positif HA dan kelompok air alkali tunggal berdasarkan uji *shapiro wilk* tidak berdistribusi normal dengan nilai *p-value* $< 0,05$, namun pada kelompok kontrol negatif, kelompok ekstrak daun pegagan 10%, dan kelompok kombinasi terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Hasil uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang tidak homogen dengan nilai *p-value* 0,031 ($p < 0,05$). Sebaran data tidak normal dan tidak homogen maka analisis data menggunakan uji non parametrik *Kruskall Wallis*.. Hasil uji *Kruskall Wallis* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,004 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *Kruskall Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi Gen TNF- α antara kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok perbandingan	<i>p-Value</i>
K1	K2	0,394
	K3	0,002*
	K4	0,132
	K5	0,002*
K2	K3	0,015*
	K4	0,937
	K5	0,132
K3	K4	0,026*
	K5	0,180
K4	K5	0,032*

**Uji Mann Whitney dengan nilai signifikan $p < 0.05$*

Hasil uji *mann whitney* ekspresi gen TNF- α pada tabel 5.2 menunjukkan ekspresi gen TNF- α pada kelompok tikus kontrol negatif UVB terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok gel ekstrak daun pegagan 10% pada pemberian tunggal, dan terhadap kelompok pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Pemberian kontrol positif HA memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok gel ekstrak daun pegagan 10%. Serta pada kelompok air alkali tunggal memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal dan kombinasi dengan air alkali berpengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.2. Ekspresi gen TNF- α 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.

5.1.2. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap ekspresi gen MMP-1

Rerata ekspresi gen MMP-1 mengalami penurunan secara signifikan pada semua kelompok perlakuan baik perlakuan perlakuan tunggal gel ekstrak daun pegagan 10%, air alkali, dan kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali namun penurunan terhadap MMP-1 tidak berbeda secara signifikan pada kelompok kontrol positif HA dibandingkan terhadap kelompok kontrol UVB. Ekspresi

gen MMP-1 pada kelompok kontrol negatif UVB memiliki nilai tertinggi sebesar $0,00024 \pm 0,00011$. Pada kelompok kontrol positif HA dapat sedikit menurunkan ekspresi gen MMP-1 namun memiliki nilai yang mendekati kontrol negatif yaitu sebesar $0,00013 \pm 0,00004$. Pada pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% ($0,000032 \pm 0,00001$) dan air alkali ($0,000034 \pm 0,00002$), maupun pada kelompok kombinasi ($0,000035 \pm 0,00001$) terbukti terjadi penurunan ekspresi gen MMP-1 secara signifikan terhadap kelompok kontrol UVB dan kelompok kontrol HA. Nilai ekspresi gen MMP-1 terendah pada kelompok pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal (Gambar 5.3).

Tabel 5.3. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Parametrik One Way ANOVA pada Ekspresi gen MMP-1

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Ekspresi gen MMP-1						
Mean	0,00024	0,00013	0,000032	0,000034	0,000035	
Std.deviasi	0,00011	0,00004	0,00001	0,00002	0,00001	
Shapiro Wilk	0,193*	0,087*	0,554*	0,459*	0,436*	
Levene test						0,001
One Way ANOVA						0,001***

Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$

Data rerata ekspresi gen MMP-1 pada seluruh kelompok berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal pada seluruh kelompok penelitian dengan nilai *p-value* $> 0,05$. Hasil uji

homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data tidak homogen dengan nilai *p-value* 0,001 ($p < 0,05$). Sebaran data yang 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* 0,0001 ($p < 0,05$). Hasil yang signifikan pada parameterik *one-way ANOVA* maka dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane*.

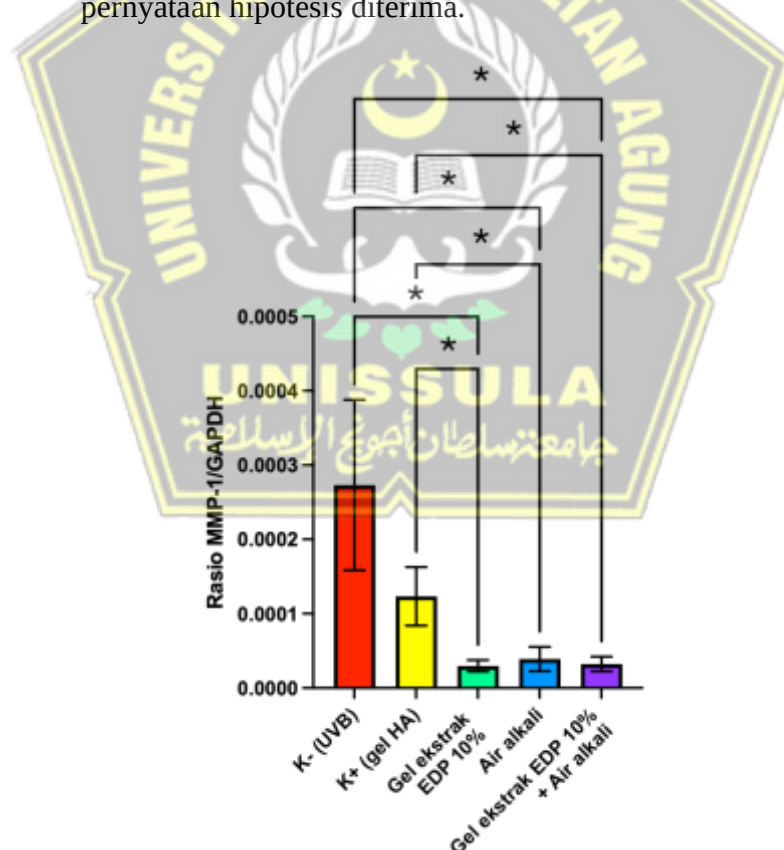
Tabel 5.4. Perbedaan Ekspresi Gen MMP-1 antara kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok perbandingan	<i>p-Value</i>
K1	K2	0,203
	K3	0,034*
	K4	0,038*
	K5	0,035*
	K3	0,018*
K2	K4	0,021*
	K5	0,018*
	K4	0,945
K3	K5	1,000
K4	K5	0,995

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

Hasil uji *post hoc Tamhane* ekspresi gen MMP-1 pada tabel 5.3 menunjukkan ekspresi gen MMP-1 pada kelompok tikus kontrol negatif UVB terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok gel ekstrak daun pegagan 10% pada pemberian tunggal, kelompok air alkali tunggal, dan terhadap kelompok pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Pemberian kontrol positif HA memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok gel

ekstrak daun pegagan 10% pada pemberian tunggal, kelompok air alkali tunggal, dan terhadap kelompok pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali. Serta pada kelompok air alkali tunggal, gel ekstrak daun pegagan 10% tunggal, dan kombinasinya tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal dan kombinasi dengan air alkali berpengaruh terhadap ekspresi gen MMP-1 pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.3. Ekspresi gen MMP-1 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 berlebihan merupakan penyebab terjadinya penuaan kulit yang ditandai dengan kondisi inflamasi pada kulit dan berkurangnya kolagen kulit⁸⁷. Respon inflamasi yang diinduksi UVB dan fotoaging kulit disebabkan oleh peningkatan produksi stress oksidatif (ROS) sehingga mengaktifasi jalur pensinyalan NF-kB di epidermis yang berdampak pada peningkatan sitokin pro-inflammasi seperti TNF- α ^{66,72}. Pada penelitian ini kelompok kontrol negatif UVB mengalami peningkatan ekspresi gen TNF- α . Peningkatan rasio ekspresi TNF- α pada kelompok UVB sama dengan ekspresi gen TNF- α pada kelompok kontrol positif HA dan kelompok pemberian tunggal air alkali. Hal ini menyebabkan kolagen terdegradasi, kondisi ini dimungkinkan HA dan air alkali tidak cukup kuat sebagai antiinflamasi. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa peningkatan kadar TNF- α pada kulit memicu ekspresi matriks metalloproteinase (MMPs) sehingga menginduksi degradasi kolagen^{88,89}. Pemberian terapi yang dapat menurunkan inflamasi dan menekan aktivitas maupun ekspresi MMPs seperti MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 dapat memberikan efek positif mencegah kolagen loss akibat paparan UVB. Pada penelitian ini terbukti bahwa pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dapat berpengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α dan MMP-1.

Gel ekstrak daun pegagan mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tannin, dan saponin. Senyawa tersebut dapat

menurunkan stress oksidatif yang diinduksi sinar UVB dengan cara meningkatkan sintesis enzim antioksidan sehingga dapat menekan inflamasi melalui penghambatan aktivasi NF- κ B⁹⁰⁻⁹³. Air alkali juga memiliki sifat antioksidan sehingga menimbulkan efek sinergis pada penelitian ini²⁵. Pada penelitian ini pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% dan juga pada kelompok yang dikombinasikan dengan air alkali dapat berpengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α secara signifikan dimungkinkan karena senyawa flavonoid dan fenolik yang terkandung pada ekstrak daun pegagan telah terbukti sebelumnya dapat menginduksi sitokin anti-inflamasi IL-10 yang berperan dalam penekanan inflamasi melalui aktivasi beberapa protein intraseluler, salah satunya adalah *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3)^{94,95}. IL-10 akan berikatan pada reseptor dan mengaktifasi jalur pensinyalan *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT-3). Protein STAT3 akan masuk ke nukleus dan mengaktifasi sekuens mRNA SOCS3. Protein SOCS3 kemudian diekspresikan secara intraseluler dan menekan berbagai jalur pensinyalan proinflamasi, salah satunya adalah NF- κ B^{96,97}. Penekanan jalur NF- κ B akan berujung pada penurunan sekresi berbagai sitokin proinflamasi seperti TNF- α yang akan menghambat proses apoptosis sel keratinosit⁹⁸. Pengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α pada kelompok tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% lebih baik dibandingkan pengaruh terhadap ekspresi gen TNF- α pada kelompok kombinasi. Hal ini membuktikan bahwa secara klinik gel ekstrak daun pegagan 10% berpotensi mencegah terjadinya collagen loss. Pada pemberian air alkali tunggal, tidak

mampu mempengaruhi ekspresi gen $\text{TNF-}\alpha$, namun setelah dilakukan kombinasi dengan gel ekstrak daun pegagan 10% dapat mempengaruhi ekspresi gen $\text{TNF-}\alpha$ secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat efek sinergis, namun potensi lebih besar akibat senyawa pada gel ekstrak daun pegagan 10%.

Paparan sinar UVB dapat menyebabkan degradasi kolagen akibat aktivitas MMP yang merusak ekstra seluler matriks (ECM). UVB yang memicu inflammasi ditandai dengan peningkatan ekspresi $\text{TNF-}\alpha$ akan menginduksi faktor transkripsi AP-1 yang memiliki peran mengontrol transkripsi gen MMP-1^{88,89}. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa $\text{TNF-}\alpha$ dapat menginduksi produksi MMP-1 dengan menghambat inhibitor MMP-1 yaitu TIMP-1 sehingga meningkatkan aktivitas MMP-1 untuk mendegradasi kolagen pada kulit⁴². Penggunaan air alkali pada penelitian ini secara tunggal tidak mempengaruhi ekspresi gen $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi gen MMP-1. Penelitian sebelumnya yang telah di laporkan bahwa air alkali memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi moderat dengan menghambat aktivitas enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga dapat menurunkan ekspresi MMP-1⁹⁹. Penelitian lain melaporkan sifat antioksidan air alkali dapat menetralkan radikal bebas yang dihasilkan oleh paparan UVB dengan menghambat jalur pensinyalan $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ¹⁰⁰. Kemampuan tersebut secara tidak langsung dapat menstimulasi produksi faktor pertumbuhan $\text{TGF-}\beta$ yang dapat meningkatkan sintesis kolagen dan menurunkan degradasi matriks ekstraseluler¹⁰¹.

Pada penelitian ini pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali memiliki aktivitas terbaik dapat mempengaruhi ekspresi gen TNF- α dan MMP-. Efektivitas 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 kulit²³. 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 ini²⁵. Temuan ini membuka perspektif baru dalam pengembangan sediaan topikal dengan kombinasi peroral air alkali untuk perbaikan kolagen loss dengan potensi aplikasi yang lebih luas dalam penanganan kondisi inflamasi kulit lainnya.

Keterbatasan pada penelitian hanya menggunakan satu dosis air alkali dan ekstrak daun pegagan serta hanya satu waktu pengamatan sehingga hubungan antara dosis dan waktu pengamatan tidak diketahui dalam penelitian ini. Pada penelitian ini juga terbatas dengan menggunakan hewan model tikus dimana perlu dilakukan uji keamanan pada manusia dengan menggunakan dosis yang sama pada penelitian ini.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2 ml dalam sehari terhadap ekspresi gen TNF- α secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.
2. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak *Centella asiatica* pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2 ml dalam sehari terhadap ekspresi gen MMP-1 secara signifikan pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

6.2. Saran

1. Diharapkan studi yang akan datang dapat menganalisis efek pemberian air alkali dan atau ekstrak daun pegagan dengan berbagai dosis terhadap efeknya terhadap perbaikan *collagen loss*.
2. Pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa pemberian krim ekstrak daun pegagan dan air alkali memiliki aktivitas yang berpengaruh terhadap hewan model collagen loss, diharapkan penelitian selanjutnya bisa dilakukan penelitian uji klinis untuk menilai toksisitas sehingga diketahui nilai letal dose (LD) yang dapat menimbulkan efek toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Buechner N, Schroeder P, Jakob S, Kunze K, Maresch T, Calles C *et al.* Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 633–637.
- 2 Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA. Wheat extract oil (WEO) attenuates UVB-induced photoaging via collagen synthesis in human keratinocytes and hairless mice. *Nutrients* 2020. doi:10.3390/nu12020300.
- 3 Phipps KR, Lee HY, Kim H, Jeon B. Oral administration of a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract (BioCell Collagen®) reduces UVB-induced photoaging in mice. *J Funct Foods* 2020. doi:10.1016/j.jff.2020.103870.
- 4 Kang YM, Hong CH, Kang SH, Seo DS, Kim SO, Lee HY *et al.* Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater* 2020. doi:10.3390/jfb11010003.
- 5 Chan ZCK, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett* 2020; **724**: 134822.
- 6 Ryu JY, Na EJ. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. *Biomedical Dermatology* 2018; **2**. doi:10.1186/s41702-018-0023-x.
- 7 Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biology* 2008; **27**: 682–692.
- 8 Liu HM, Cheng MY, Xun MH, Zhao ZW, Zhang Y, Tang W *et al.* Possible Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Skin Cellular Senescence, Inflammation, and Cancer and the Therapeutic Potential of Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2023; **24**. doi:10.3390/ijms24043755.
- 9 Fernando Venesia N, Fachrial E, Nyoman I, Lister E. Effectiveness Test of Centella Asiatica Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (*Rattus Norvegicus* Wistar). *Technology, and Sciences (ASRJETS) American Scientific Research Journal for Engineering* 2020; **65**: 98–107.

- 10 Park G, Oh DS, Kim YU, Park MK. Acceleration of Collagen Breakdown by Extracellular Basic pH in Human Dermal Fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol* 2016; **29**: 204–209.
- 11 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for inducing hyperalgesia in healthy subjects. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
- 12 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; **70**: 7–30.
- 13 Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015. doi:10.1111/phpp.12145.
- 14 Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *et al*. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci* 2022; **10**: 1–7.
- 15 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
- 16 Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
- 17 Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients* 2016; **8**: 8–11.
- 18 Zahara K, Bibi Y, Tabassum S. Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. 2014.
- 19 Sun B, Wu L, Wu Y, Zhang C, Qin L, Hayashi M *et al*. Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Front Pharmacol*. 2020; **11**. doi:10.3389/fphar.2020.568032.
- 20 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.
- 21 Kandasamy A, Aruchamy K, Rangasamy P, Varadhaiyan D, Gowri C, Oh TH *et al*. Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Centella Asiatica* Extracts: An Experimental and Theoretical Investigation of Flavonoids. *Plants* 2023; **12**. doi:10.3390/plants12203547.

- 22 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.
- 23 Lee M, Fadriquela A, Antonio JM, Kim CS, Cho IY, Kim KE *et al*. Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes* 2022; **10**. doi:10.3390/pr10081543.
- 24 Liu L, Lin C, Li X, Cheng Y, Wang R, Luo C *et al*. Protective Effect of Alkaline Mineral Water on Calcium Oxalate-Induced Kidney Injury in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2023; **2023**: 1–10.
- 25 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; **9**. doi:10.3390/pr9101828.
- 26 Rias YA, Kurniawan AL, Chang CW, Gordon CJ, Tsai HT. Synergistic effects of regular walking and alkaline electrolyzed water on decreasing inflammation and oxidative stress, and increasing quality of life in individuals with type 2 diabetes: A community based randomized controlled trial. *Antioxidants* 2020; **9**: 1–17.
- 27 Federico Ebau ASMLMMMVCMPGE. Ekstrak Centella Asiatica-nonokomposit SiO₂ : Lebih dari sekedar sistem Penghantar Obat Untuk Perlindungan Kulit Dari Kerusakan Oksidatif . 2022.
- 28 Sanguansajapong V, Sakdiset P, Puttarak P. Development of Oral Microemulsion Spray Containing Pentacyclic Triterpenes-Rich Centella asiatica (L.) Urb. Extract for Healing Mouth Ulcers. *Pharmaceutics* 2022; **14**. doi:10.3390/pharmaceutics14112531.
- 29 Huang J, Tu T, Wang W, Zhou G, Zhang W, Wu X *et al*. Asiatic Acid Glucosamine Salt Alleviates Ultraviolet B-induced Photoaging of Human Dermal Fibroblasts and Nude Mouse Skin. *Photochem Photobiol* 2020; **96**: 124–138.
- 30 Khotimah H, Setiawan A, Rita CI, Mardiyah M, Ali A, Sukatman MP *et al*. In silico studies of natural compounds of Centella Asiatica as anti-aging and wound healing agents. In: *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics Inc., 2021 doi:10.1063/5.0053016.
- 31 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017; **1863**: 585–597.

- 32 Shin JM, Kim MY, Sohn KC, Jung SY, Lee HE, Lim JW *et al.* Nrf2 negatively regulates melanogenesis by modulating PI3K/Akt signaling. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0096035.
- 33 Stipcevic T, Piljac J, Berghe D Vanden. Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts. *Plant Foods for Human Nutrition* 2006; **61**: 29–34.
- 34 Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D *et al.* Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; **269**: 89–99.
- 35 Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM *et al.* Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2012; **674**: 80–86.
- 36 Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014; **1843**: 2563–2582.
- 37 Supit IA, Pangemanan DHC, Marunduh SR. PROFIL TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α) BERDASARKAN INDEKS MASSA TUBUH (IMT) PADA MAHASISWA FAKULTAS KEDOKTERAN UNSRAT ANGKATAN 2014. Mei-Agustus, 2015.
- 38 Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J *et al.* Oncotarget 7204 www.impactjournals.com/oncotarget Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. 2018www.impactjournals.com/oncotarget/.
- 39 Parwata IMO. Antioksidan. 2015.
- 40 Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; **20**: 1126–1167.
- 41 Pardo A, Selman M. MMP-1: The elder of the family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005; **37**: 283–288.
- 42 Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH *et al.* Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2015; **80**: 54–60.
- 43 Yu J, He Z, He X, Luo Z, Lian L, Wu B *et al.* Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for MMPs in Human Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2021; **11**: 1–13.

- 44 Ujfaludi Z, Tuzesi A, Majoros H, Rothler B, Pankotai T, Boros IM. Coordinated activation of a cluster of MMP genes in response to UVB radiation. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–10.
- 45 Egrilmez MY, Kocturk S, Aktan S, Oktay G, Resmi H, Keskin HS *et al.* Melatonin Prevents UVB-Induced Skin Photoaging by Inhibiting Oxidative Damage and MMP Expression through JNK/AP-1 Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *Life* 2022; **12**. doi:10.3390/life12070950.
- 46 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al.* UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.
- 47 Sutardi S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 2017; **35**: 121.
- 48 Zahara K. Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. *Pure and Applied Biology* 2014; **3**: 152–159.
- 49 max rank. Daun Pegagan: Kandungan dan Manfaatnya bagi Kesehatan . <https://umsu.ac.id/health/daun-pegagan-kandungan-dan-manfaatnya-bagi-kesehatan/> 2024.
- 50 Vasantharuba S, Sundaram SP, Thangaiah A, Seevaratnam V, Banumathi P, Premalatha MR *et al.* Functional properties of *Centella asiatica* (L.): A review. 2012<https://www.researchgate.net/publication/286360480>.
- 51 Citra Nur Mutiarahmi dkk. Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan. 2023.
- 52 Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya B. Efek Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar I Made Subhawa Harsa. 2020.
- 53 Bajgai J, Kim CS, Rahman MH, Jeong ES, Jang HY, Kim KE *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes*. 2022; **10**. doi:10.3390/pr10010087.
- 54 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 55 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.

- 56 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.
- 57 Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
- 58 Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 6098–6107.
- 59 Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC *et al*. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012; **32**: 428–438.
- 60 Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM. Hijacking of the AP-1 signaling pathway during development of ATL. *Front Microbiol* 2018; **8**: 1–13.
- 61 Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol* 1967; **33**: 27–42.
- 62 Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1341–1353.
- 63 Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 2020; : 1–16.
- 64 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 65 Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
- 66 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**. doi:10.1155/2017/8379539.
- 67 Erth VPW, Williams;I' KJ, Fis EA, Bashir M, Rosenbloom J, Iaomei Shi X. UVB Irradiation Alters Cellular Responses to Cytokines: Role in Extracellular Matrix Gene Expression. .

- 68 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.
- 69 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; **10**: 273–280.
- 70 Ramli S, Ruangrunsi N. Tyrosinase inhibition, antioxidant activity and total phenolic content of selected Mimosaceae pericarps ethanolic extracts. 2021.
- 71 Varela MT, Ferrarini M, Mercaldi VG, Sufi B da S, Padovani G, Nazato LIS *et al*. Coumaric acid derivatives as tyrosinase inhibitors: Efficacy studies through in silico, in vitro and ex vivo approaches. *Bioorg Chem* 2020; **103**: 104108.
- 72 Wölfle 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.
- 73 Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang S Bin, Park SJ *et al*. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via shp-2 oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**: 2528–2540.
- 74 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 75 Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012; **1820**: 1693–1703.
- 76 Currò M, Risitano R, Ferlazzo N, Cirimi S, Gangemi C, Caccamo D *et al*. Citrus bergamia Juice Extract Attenuates β -Amyloid-Induced Pro-Inflammatory Activation of THP-1 Cells Through MAPK and AP-1 Pathways. *Sci Rep* 2016; **6**: 1–11.
- 77 Baumann D, Drebant J, Hägele T, Burger L, Serger C, Lauenstein C *et al*. P38 MAPK signaling in M1 macrophages results in selective elimination of

- M2 macrophages by MEK inhibition. *J Immunother Cancer* 2021; **9**. doi:10.1136/jitc-2020-002319.
- 78 Yoshida M, Clinic Y, Arai T, Kagaku D, Kabushiki K, Hoshino S *et al*. IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor- β -Induction of Type I Collagen mRNA Expression via Both JNK and p38 Pathways in Human Lung Fibroblasts Original article : IL-10 Inhibits Transforming Growth Factor - β - Induction of Type I Collagen mRNA Expressio. 2005. doi:10.17877/DE290R-8281.
 - 79 Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of smad2/3-dependent signaling pathways: Potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med* 2013; **31**: 1148–1152.
 - 80 Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013; **53**: 401–426.
 - 81 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.
 - 82 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.
 - 83 Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An Experimental Model Design for Photoaging. *Journal of Craniofacial Surgery* 2015. doi:10.1097/SCS.0000000000001902.
 - 84 Sari SP, Zulkarnain AK. Physical Stability of Binahong Leaf Extract (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) with Hydroxypropyl Methylcellulose and Hydroxyethyl Cellulose Gelling Agents. *Majalah Obat Tradisional* 2023; **28**: 60–68.
 - 85 Zukhiroh Z, Putra A, Chodidjah C, Sumarawati T, Subchan P, Trisnadi S *et al*. Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on Regulating SOD and MMP-1 mRNA Expressions in Skin Hyperpigmentation Rats. *Open Access Maced J Med Sci* 2022; **10**: 1–7.
 - 86 Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, Miller KJ, Ehanire T, Quiles C *et al*. A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair and Regeneration* 2014; **22**: 755–764.
 - 87 Sayama K, Yuki K, Sugata K, Fukagawa S, Yamamoto T, Ikeda S *et al*. Carbon dioxide inhibits UVB-induced inflammatory response by activating

- the proton-sensing receptor, GPR65, in human keratinocytes. *Sci Rep* 2021; **11**. doi:10.1038/s41598-020-79519-0.
- 88 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**: 325–334.
 - 89 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**: 994–1001.
 - 90 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
 - 91 Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA, Savarimuthu I. Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* 2017. doi:10.5772/68095.
 - 92 Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci* 2018; **208**: 111–122.
 - 93 Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 2014; **23**: 239–244.
 - 94 Lancellotti P, Oury C. IL-10 targets myofibroblasts and dampens cardiac fibrosis. *J Public Health Emerg* 2017. doi:10.21037/jphe.2017.10.03.
 - 95 Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 2017; **112**: 1–14.
 - 96 Wang CQF, Akalu YT, Suarez-Farinas M, Gonzalez J, Mitsui H, Lowes MA *et al.* IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: Potential relevance to psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; **133**: 2741–2752.
 - 97 Eichner A, Hänsel M, Domino KB, Hübner M. Mechanisms regulating melanogenesis. *Complications and Mishaps in Anesthesia: Cases - Analysis - Preventive Strategies* 2014; **9783642454**: 233–242.
 - 98 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci* 2018; **210**: 201–208.

- 99 Buono D, D'orta A, Monaco D, Paolo DM, Blasio D, Martino D. Alkaline Water Modules and Their Impact on Inflammation Genes: An In Vitro Model for Cancer Prevention. 2020<http://www.bioinformatics.nl/>.
- 100 Bajgai J, Lee M, Jang YG, Lee K, Sharma S, Jeong YJ *et al*. Effects of Drinking Electrolyzed Alkaline-Reduced Water on Functional Dyspepsia: A Randomized, Double-Blind, Controlled Prospective Trial. *Processes* 2023; **11**. doi:10.3390/pr11030968.
- 101 He T, Quan T, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Oxidative exposure impairs TGF- β pathway via reduction of type II receptor and SMAD3 in human skin fibroblasts. *Age (Omaha)* 2014; **36**: 1079–1094.

