

**PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) DAN AIR ALKALI SECARA ORAL TERHADAP
EKSPRESI GEN *TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β* (TGF- β)
DAN DENSITAS KOLAGEN**

(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Wistar Model

***Collagen Loss*)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

Ria Hartanti

MBK2322010391

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

2025

TESIS

**PENGARUH GEL TOPIKAL EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) DAN AIR ALKALI SECARA ORAL TERHADAP EKSPRESI
GEN *TRANSFORMING GROWTH*
FACTOR- β (TGF- β) DAN DENSITAS KOLAGEN
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Wistar Model *Collagen Loss*)**

Disusun oleh :

Ria Hartanti

MBK2322010391

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

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,


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

Pembimbing II,


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

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula


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

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,



Ria Hartanti

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 *TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β* (TGF- β) DAN DENSITAS KOLAGEN (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.
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 Titiek Sumarawati,M.Kes selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. 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.
7. 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,

Ria Hartanti

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan kronik sinar UVB menyebabkan *collagen loss* akibat penurunan ekspresi gen TGF- β sehingga menyebabkan *collagen loss*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan (EDP) dan air alkali terhadap ekspresi gen TGF- β dan jumlah densitas kolagen 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 ini merupakan tikus jantan wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok K1 (tikus kontrol negatif dengan paparan UVB), K2 (tikus kontrol positif yang dipapar UVB 160mj/cm² 5 kali seminggu selama 2 minggu dan diberi perlakuan *hyaluronic acid*), K3 (mendapat perlakuan gel EDP 10%), K4 (mendapat perlakuan air alkali peroral) dan K5 (mendapat perlakuan kombinasi gel EDP 10% dan air alkali). Analisis ekspresi gen TGF- β dilakukan dengan metode qRT-PCR dan densitas kolagen dengan pewarnaan *masson trichome*. Analisis uji statistik deskriptif dilanjutkan dengan uji normalitas dan homogenitas, dan uji non parametrik *kruskall Wallis* untuk data TGF- β dan uji parameterik ANOVA untuk data kolagen.

Hasil: Ekspresi gen TGF- β pada K1 ($0,00036 \pm 0,00002$), K2 ($0,00048 \pm 0,00013$), K3 ($0,00055 \pm 0,00004$), dan K4 ($0,00080 \pm 0,00011$) dan K5 ($0,00137 \pm 0,00080$), dengan K5 meningkatkan ekspresi gen TGF- β secara signifikan dibandingkan K1. Kadar kolagen pada K1 $15,32 \pm 5,71$, K2 ($39,76 \pm 7,74$), K3 ($25,94 \pm 2,28$), K4 ($21,19 \pm 1,75$) dan K5 ($47,39 \pm 6,14$), dengan K5 secara signifikan meningkatkan kadar kolagen dibandingkan K1.

Kesimpulan: Pemberian gel EDP dan air alkali berpengaruh terhadap ekspresi gen TGF- β dan dan densitas kolagen pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB yang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K2).

Kata Kunci: daun pegagan, air alkali, TGF- β , densitas kolagen, *collagen loss*

ABSTRACT

Background: Chronic UVB radiation exposure leads to collagen loss due to decreased TGF- β gene expression. This study aimed to investigate the effects of a combination of *Centella asiatica* leaf extract (CALE) gel and alkaline water on TGF- β gene expression and collagen density in UVB-induced collagen loss rat models.

Methods: This in vivo experimental study employed a posttest-only control group design with a completely randomized method. Male Wistar rats were divided into five groups: K1 (negative control with UVB exposure), K2 (positive control exposed to 160mJ/cm² UVB 5 times weekly for 2 weeks and treated with hyaluronic acid), K3 (treated with 10% CALE gel), K4 (treated with oral alkaline water), and K5 (treated with a combination of 10% CALE gel and alkaline water). TGF- β gene expression was analyzed using qRT-PCR, and collagen density was assessed through Masson's trichrome staining. Statistical analysis included descriptive statistics, normality and homogeneity tests, Kruskal-Wallis test for TGF- β data, and ANOVA for collagen data.

Results: TGF- β gene expression levels were: K1 (0.00036 $\pm$ 0.00002), K2 (0.00048 $\pm$ 0.00013), K3 (0.00055 $\pm$ 0.00004), K4 (0.00080 $\pm$ 0.00011), and K5 (0.00137 $\pm$ 0.00080), with K5 significantly increasing TGF- β gene expression compared to K1. Collagen levels were: K1 (15.32 $\pm$ 5.71), K2 (39.76 $\pm$ 7.74), K3 (25.94 $\pm$ 2.28), K4 (21.19 $\pm$ 1.75), and K5 (47.39 $\pm$ 6.14), with K5 significantly increasing collagen levels compared to K1.

Conclusion: The combination of CALE gel and alkaline water significantly influenced TGF- β gene expression and collagen density in UVB-induced collagen loss rat models compared with positive control (K2).

Keywords: *Centella asiatica* leaf, alkaline water, TGF- β , collagen density, collagen loss

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	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>Transforming Growth Factor β</i> (TGF- β)	10
2.1.1. Definisi TGF- β	10
2.1.2. Aktivitas TGF- β dalam Sintesis Kolagen.....	13
2.2. Kolagen	14
2.2.1. Definisi	14
2.2.2. Jenis Kolagen.....	15
2.2.3. Mekanisme Kerusakan Kolagen.....	17

2.2.4. Sintesis Kolagen	18
2.3. Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	22
2.3.1. Definisi Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	22
2.3.2. Peran Ekstrak <i>Centella asiatica</i> sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi	23
2.4. Air Alkali.....	26
2.4.1. Definisi Air Alkali.....	26
2.4.2. Peran Air Alkali dalam Mencegah Degradasi Kolagen	27
2.5. Pengaruh pemberian ekstrak <i>Centella asiatica</i> dan kombinasi air alkali terhadap ekspresi TGF- β dan densitas kolagen	28
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	30
3.1. Kerangka Teori.....	30
3.2. Kerangka Konsep	34
3.3. Hipotesis.....	34
BAB IV METODE PENELITIAN	35
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	35
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	36
4.2.1. Variabel Penelitian	36
4.2.2. Definisi Operasional	36
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	38
4.3.1. Subjek Penelitian	38
4.3.2. Sampel Penelitian	39
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian.....	39
4.3.4. Besar Sampel	40
4.4. Alat dan Bahan	40
4.4.1. Alat	40
4.4.2. Bahan.....	41
4.5. Cara Penelitian	41
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	41
4.5.2. Pembuatan Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	41
4.5.3. Pembuatan Gel Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	42

4.5.4. Model Collagen loss dengan Paparan UVB	42
4.5.5. Pengambilan Sampel Jaringan.....	43
4.5.6. Pembuatan Blok Parafin	44
4.5.7. Pengecatan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen.....	44
4.5.8. Analisis Kuantitatif Ekspresi TGF- β dan Densitas Kolagen menggunakan RT-PCR.....	45
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.7. Analisa Data	46
4.8. Alur Penelitian.....	48
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
5.1. Hasil Penelitian	51
5.1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap ekspresi gen TGF- β	51
5.1.2. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air Alkali terhadap Jumlah Densitas Kolagen	55
5.2. Pembahasan.....	59
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1. Kesimpulan.....	63
6.2. Saran.....	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	74

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>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

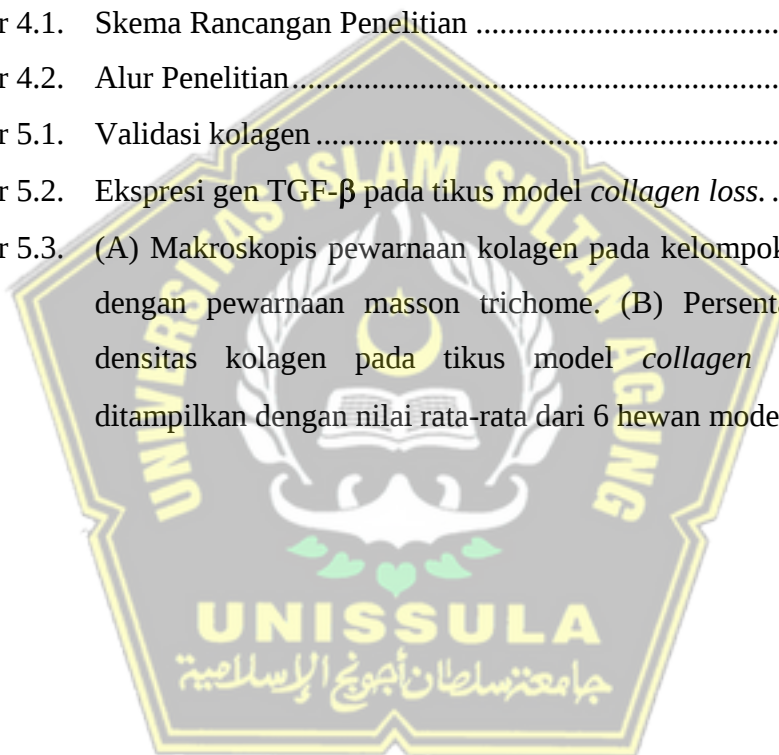
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1.	Komposisi gel ekstrak <i>Centella asiatica</i>	42
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Non Parametrik pada Ekspresi Gen TGF- β	51
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi Gen TGF- β antara kelompok penelitian dengan uji <i>Mann Whitney</i>	53
Tabel 5.3.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Parametrik pada jumlah densitas kolagen	55
Tabel 5.4.	Perbedaan kadar jumlah densitas kolagen antara kelompok penelitian dengan uji <i>Post hoc LSD</i>	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ilustrasi skematis ekspresi dan lokalisasi kolagen individu di kulit.....	17
Gambar 2.2.	Mekanisme sintesis kolagen	22
Gambar 2.3.	Daun Pegagan.....	23
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	33
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	34
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	35
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	48
Gambar 5.1.	Validasi kolagen	50
Gambar 5.2.	Ekspresi gen TGF- β pada tikus model <i>collagen loss</i>	54
Gambar 5.3.	(A) Makroskopis pewarnaan kolagen pada kelompok penelitian dengan pewarnaan masson trichome. (B) Persentase jumlah densitas kolagen pada tikus model <i>collagen loss</i> . Data ditampilkan dengan nilai rata-rata dari 6 hewan model $\pm$ SD.....	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearence</i>	74
Lampiran 2.	Analisis Statistika	75
Lampiran 3.	Surat Keterangan Penelitian	85
Lampiran 4.	Hasil Analisis.....	86
Lampiran 5.	Dokumentasi penelitian	88



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radiasi *ultraviolet B* (UVB) merupakan komponen sinar matahari yang diketahui memiliki beberapa efek merugikan pada kulit. Paparan UVB yang berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan kulit seperti *collagen loss*. Salah satu mekanisme utama di mana UVB memberikan efek merugikannya adalah melalui induksi sitokin pro-inflamasi, seperti *interleukin-1* (IL-1) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α)¹⁻³, menginduksi stress oksidatif yang dapat merangsang aktivasi jalur *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) untuk menjalankan transkripsi sitokin pro-inflamasi^{4,5}. Status inflamasi pada kulit berkontribusi pada degradasi kolagen di kulit melalui jalur *activator-protein 1* (AP-1) yang menghambat *growth factor transforming growth factor- β* (TGF- β) untuk menginduksi sintesis kolagen pada sel fibroblast^{6,7}. Pencegahan paparan UVB saat ini banyak menggunakan bahan kosmetika kimia dan fisik untuk melindungi kulit dari dampak paparan UVB akut. Bahan kimia yang terkandung di dalam kosmetik merupakan senyawa aromatik dengan gugus karbonil dan dapat mengiritasi terutama pada kulit sensitif. Penggunaan senyawa alami sangat diperlukan dalam mengatasi permasalahan paparan UVB akut dengan minimal efek samping⁸⁻¹⁰. Penelitian sebelumnya melaporkan ekstrak *Centella asiatica* memiliki aktivitas antiinflamasi dan anti oksidan. Saat ini, penggunaan air alkali sebagai adjuvant dalam pengobatan telah terbukti

efektif mengurangi stress oksidatif yang merupakan contributor utama degradasi kolagen. Menggabungkan ekstrak *Centella Asiatica* dengan air alkali dapat menawarkan efek sinergis dalam mencegah kerusakan kolagen pada kulit akibat paparan sinar UVB.

Populasi di Asia Tenggara salah satunya Indonesia yang dilalui garis khatulistiwa memiliki paparan sinar matahari yang cukup kuat. Paparan sinar UVB dapat menyebabkan kerusakan sebesar 80% yang memicu degradasi kolagen. Sekitar 40% - 50% perempuan serta 20% - 40% laki-laki usia 24 – 29 tahun menderita *photodamage* yang salah satunya ditandai dengan *collagen loss*. Prevalensi *collagen loss* pada perempuan dewasa sekitar 70% dan laki-laki dewasa sekitar 60%¹¹.

Paparan UVB pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS yang secara langsung menginduksi kerusakan DNA dan memicu sekresi interleukin (IL)-6, yang mengakibatkan overekspresi MMP-1 dan berdampak pada penurunan sintesis kolagen^{12,13}. Penurunan sintesis kolagen juga disebabkan akibat ROS menghambat ekspresi *growth* TGF- β melalui penghambatan aktivasi kompleks SMAD *family member 2* (SMAD2) dan SMAD *family member 3* (SMAD3) yang berujung pada penghambatan sintesis prokolagen 1 sebagai prekursor kolagen^{14,15}. *Centella Asiatica* memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan yang telah banyak di teliti diberbagai jenis penyakit kulit seperti psoriasis dan hipigmentasi¹⁶. Mekanisme daun pegagan (*Centella Asiatica*) sebagai antiinflamasi melalui senyawa aktifnya, *flavonoid*, *terpenoid*, *alkaloid*,

tannin, dan *saponin*. Kandungan *flavonoid* pada *Centella Asiatica* berpotensi untuk melindungi dari sinar matahari, potensi tersebut disebabkan karena adanya gugus kromofor dengan sistem aromatik terkonjugasi yang dapat menyerap sinar UV A dan UV B¹⁷. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa daun pegagan (*Centella asiatica*) melindungi terhadap kerusakan keratinosit HaCaT yang diinduksi UVB melalui perubahan ekspresi mikroRNA¹⁸. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% dapat meningkatkan produksi kolagen dan menjaga elastisitas kulit yang terpapar UVB¹⁹. Ekstrak *Centella asiatica* juga telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi moderat dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi melalui regulasi jalur JAK/STAT3¹⁶. Penelitian lain melaporkan bahwa air alkali dapat membantu menjaga kolagen dengan mengurangi keasaman tubuh secara keseluruhan²⁰. Air alkali mengandung tingkat antioksidan yang lebih tinggi, yang dapat membantu melindungi kolagen yang ada dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan paparan UVB²¹.

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^{22,23}. Air alkali dengan dosis 10mL/kg berat badan tikus dapat membantu menjaga kolagen dengan mengurangi keasaman tubuh secara keseluruhan²⁰. Kemampuan *Centella asiatica* dalam meregulasi TGF- β 1 sehingga dapat menginduksi myofibroblast menjadi fibroblast dan menyebabkan sintesis

kolagen^{16,24}. 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 TGF- β dan jumlah densitas kolagen 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 terhadap ekspresi gen TGF- β dan jumlah densitas kolagen pada tikus galur wistar yang mengalami *collagen loss* akibat diinduksi sinar UVB.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TGF- β dan jumlah densitas kolagen 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 mengetahui pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TGF- β dan

jumlah densitas kolagen pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari terhadap ekspresi gen TGF- β pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan pada dosis 10% dan air alkali secara oral 3x2ml dalam sehari terhadap jumlah densitas kolagen 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 ekstrak daun pegagan yang dikombinasi dengan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TGF- β dan jumlah densitas kolagen pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan gel ekstrak daun pegagan yang dikombinasi dengan air alkali 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) ²⁵	<i>Centella asiatica extract- SiO2 nanocomposite: More than a drug-delivery system for skin protection from oxidative damage</i>	In vitro 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) ²⁶	<i>Development of Oral Microemulsion Spray Containing Pentacyclic Triterpenes-Rich Centella Asiatica (L.) Urb.Extract For Healing Mouth Ulcers</i>	In vitro 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) ²⁷	<i>Asiatic Acid Glucosamine Salt Alleviates Ultraviolet B-induced Photoaging of Human Dermal Fibroblasts and Nude Mouse Skin</i>	In vitro and In vivo	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) ²⁸	<i>In silico studies of natural compounds of Centella Asiatica as anti-aging and wound healing agents</i>	In Silico	Senyawa obat efektif dari <i>Centella asiatica</i> L. yang dapat melawan protein penyebab penuaan dan penyembuhan luka.
5	Fernando Venesia, et.al (2022) ¹⁹	<i>Effectiveness Test of Centella Asiatica Extract on Improvement of Collagen an Hydration in female white rat (rattus norwegicus wistar)</i>	In vivo	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) ²⁰	<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 mengurasi stress oksidatif berlebihan dan mengatur pH kulit pada tikus model stress dan kelelahan.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa nanokomposit SiO₂ yang mengandung ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) memiliki sifat struktural yang baik dan efek perlindungan terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif²⁵. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diberikan secara topical yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen. 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 gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diberikan secara topical yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen. 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 gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diberikan secara topical yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa senyawa obat efektif dari daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dapat melawan protein penyebab penuaan dan penyembuhan luka. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diberikan secara topical yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen. 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 gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diberikan secara topical yang dikombinasi dengan air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen. Air alkali yang diberikan secara peroral terbukti memiliki kemampuan mengurangi stress oksidatif berlebihan dan mengatur pH kulit pada tikus model stress dan kelelahan²⁰. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana gel ekstrak *Centella asiatica* diberikan secara topical yang dikombinasi dengan

air alkali secara oral akan diberikan pada tikus model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB dan dianalisis ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Transforming Growth Factor β* (TGF- β)

2.1.1. Definisi TGF- β

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah senyawa protein yang diturunkan dari keping darah selain EGF dan PDGF dan memiliki dua jenis subtype yaitu TGF alpha dan TGF beta²⁹. *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) merupakan hormon mitogenik yang disekresi oleh sel kanker dan fibroblas yang termodifikasi oleh infeksi retroviral dan memiliki panjang 50 AA dengan gugus disulfida yang menghubungkan deret 8-Cys-Cys-21, 16-Cys-Cys-32, 34-Cys-Cys-43; dan memiliki gugus fungsional lain yaitu Phe-15, Arg-42, dan Leu-48³⁰. Hormon ini bersinergis dengan faktor pertumbuhan yang lain seperti TGF- β dan mengaktifasi perubahan fenotipe pada sel, seperti transisi epitelial-mesenkimal, sehingga berperan dalam onkogenesis selain dalam penyembuhan. Peningkatan rasio kompleks pencerap TGF- α dan EGF terjadi pada kasus kanker³¹. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah walaupun menghambat proliferasi sel endotelial dan merupakan senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag, sehingga pada sel tumor sering dijumpai rasio makrofag yang sangat tinggi. Walaupun bersifat immunosupresif,

TGF- β menghambat pertumbuhan kanker ovarium; dan bersama faktor osteoinduksi menstimulasi pembentukan tulang³².

Molekul TGF- β mengarahkan aktivitasnya melalui mode aksi intrakrin, autokrin, parakrin dan endokrin³³. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) berperan penting dalam beberapa proses seluler yang meliputi proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan apoptosis yang diperlukan untuk menjaga homeostasis suatu jaringan³⁴. Pada kondisi normal, TGF- β berperan dalam memberikan efek apoptosis, hal ini penting untuk diferensiasi dan regenerasi sel, apabila TGF- β berada pada kadar yang tinggi maka akan menyebabkan terjadinya kematian sel secara masif, pada sel hepar akan menyebabkan fibrosis dan sirosis. Pada proses tumorigenesis tahap awal, TGF- β berperan sebagai faktor supresor, namun apabila terjadi aktivasi sinyal pengaktifan TGF- β yang berlebihan justru akan berkontribusi terhadap berlanjutnya progresi tumor oleh karena terjadinya resistensi efek supresif³⁵.

Faktor pertumbuhan ini terdiri dari tiga isoform berbeda yang diekspresikan dalam jaringan mamalia: TGF- β 1, 2 dan 3, dikodekan oleh gen yang terletak di kromosom berbeda³⁶. Isoform 1 dan 2 memiliki fungsi yang hampir sama dalam hal efek biologis, sedangkan isoform 3 cenderung memberikan beberapa aktivitas yang berlawanan dengan kedua isoform tersebut. Faktor pertumbuhan TGF- β 1 adalah polipeptida dalam keluarga *transforming growth*

factor beta sitokin. *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1) merupakan protein yang disekresi untuk fungsi sel-sel kebanyakan termasuk untuk mengontrol pertumbuhan sel, proliferasi sel, differensiasi sel dan apoptosis. *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1) merupakan isoform yang paling melimpah dan diekspresikan untuk meregulasi biologis, termasuk untuk mengaktivasi sel fibroblas dalam proses pembentukan kolagen³⁷.

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah peptida multifungsi yang mengatur proliferasi, difrensiasi, dan fungsi-fungsi lain dalam berbagai jenis sel. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) bekerja secara sinergis dengan TGF- α dalam menginduksi transformasi. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) juga bekerja dengan mekanisme negatif untuk faktor pertumbuhan autokrin. Disregulasi aktivasi dan sinyal TGF- β akan menyebabkan apoptosis. Ada banyak sel yang mensintesis TGF- β dan hampir semua dari sel-sel itu memiliki reseptor spesifik untuk peptida ini. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β 1), TGF- β 2, dan TGF- β 3 semuanya berfungsi melalui sistem sinyal reseptor yang sama^{38,39}.

Faktor pertumbuhan TGF- β 3 diisolasi dari garis sel rhabdomyosarcoma²⁹. Selain itu, setiap isoform menyajikan homologi antarspesies yang tinggi di sepanjang mamalia, lebih besar dari 97%, bahkan mencapai lebih dari 99% di antara manusia dan spesies hewan pengerat eksperimental Keseimbangan proses seluler

diperlukan untuk menjaga homeostasis suatu jaringan. TGF- β merupakan sitokin multifungsional yang berperan penting dalam regulasi beberapa proses seluler termasuk *self renewal* dan diferensiasi sel. Sifat pleiotropik TGF- β berimplikasi pada munculnya suatu proses patologis apabila terjadi deregulasi pada jalur pengaktifannya sehingga TGF- β juga berperan dalam meregulasi homeostasis. Jalur sinyal TGF- β berperan dominan pada diferensiasi sel dengan mengatur ekspresi gen-gen yang berfungsi dalam proses proliferasi sel dan perbaikan jaringan. Proses perkembangan stem cell yang meliputi *self renewal* dan diferensiasi sel dipengaruhi oleh faktor intrinsik yang terdiri dari epigenetik dan faktor transkripsi utama, sedangkan faktor ekstrinsik yang berpengaruh terdiri dari inhibitor dan jalur sinyal. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) berperan dalam mengaktifkan sinyal proliferasi sel⁴⁰⁻⁴².

2.1.2. Aktivitas TGF- β dalam Sintesis Kolagen

Kolagen merupakan ECM paling penting didermis kulit sehingga berkurangnya kolagen akan menyebabkan berkurangnya elastisitas kulit, kulit kendur dan menua. Paparan UVB yang intens dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen bahkan dapat menginduksi penghentian siklus pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan

fungsi sel⁴³. Untuk berinteraksi dengan serat kolagen, fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler. Myofibroblast diregulasi oleh sitokin TGF- β . *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1) yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β receptor (TGF β R) yang menstimulasi pensinyalan intraseluler yang mendorong produksi α -SMA. Transduksi mekanis ECM ke-sel melalui jalur focal adhesion (FA) mengaktifkan RhoA yang mengarah pada produksi stress fibers α -SMA. Selain itu, extra-domain A containing fibronectin (EDA-FN) yang diaktifkan TGF- β 1 meningkatkan protein EDA-FN dalam ECM dan kontraksi sel yang dilakukan oleh stress fibers α -SMA mengubah konformasi latency associated peptide (LAP) melalui interaksi integrin/LAP yang melepaskan 11 TGF- β 1 dari LAP^{44,45}.

2.2. Kolagen

2.2.1. 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 manusia⁴⁶. Kolagen 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 ⁴⁷. 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 ⁴⁶. Karena kolagen-1 yang mendominasi organ kulit, maka kolagen-1 yang akan diukur pada penelitian kali ini.

2.2.2. Jenis Kolagen

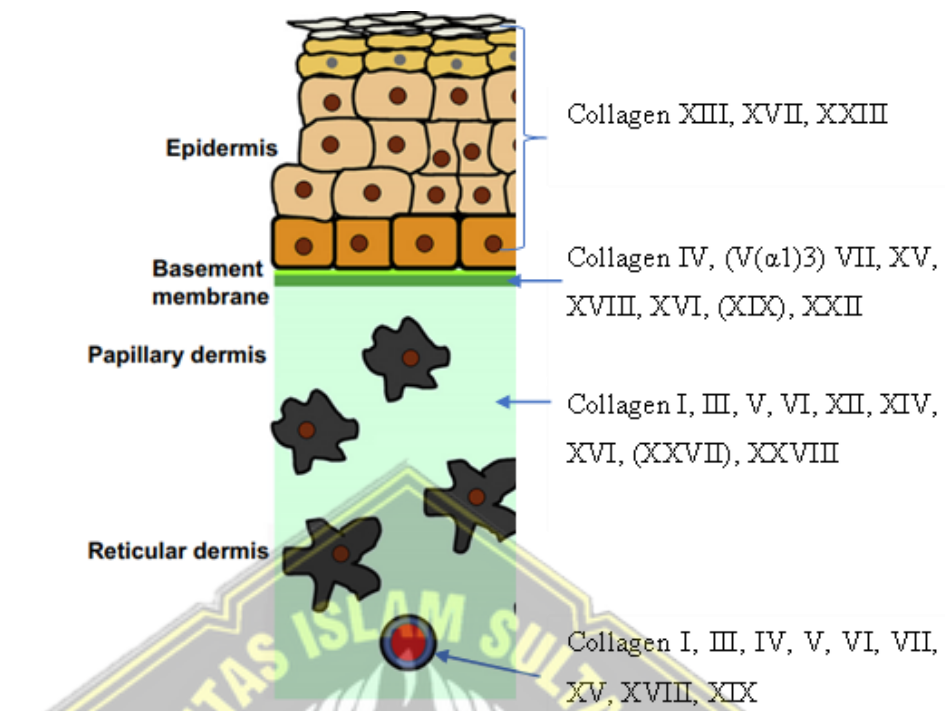
Kolagen adalah keluarga protein matriks ekstraseluler yang paling melimpah pada vertebrata. Protein dalam superfamili kolagen semuanya memiliki tiga rantai polipeptida dengan urutan berulang - Gly-Xaa-Yaa- yang diperlukan, Xaa dan Yaa tersusun atas prolin dan 4-hidroksiprolin masing-masing. Saat ini, kolagen

diklasifikasikan ke dalam 28 jenis sebagai tipe I, II, III, ..., XXVIII.

Kolagen tersebut juga disebut 'kolagen tipe N', atau 'kolagen N'.⁴⁸

Berdasarkan 28 jenis yang telah teridentifikasi, kolagen diklasifikasikan sebagai kolagen fibrilar klasik (I, II, III, V, dan XI), kolagen membran basal (IV), kolagen zona membran basal (XV dan XVIII), kolagen tipe VI, kolagen tipe VII, kolagen rantai pendek (VIII dan X), *fibril-associated collagen with interrupted triple helices* (IX, XII, dan XIV), kolagen mirip FACIT (XVI, XIX, XX, XXI, dan XXII), kolagen transmembran (XIII, XVII, XXIII, dan XXV), kolagen fibrilar baru (XXIV dan XXVII), kolagen tipe XXVI, dan kolagen tipe XXVIII.

Kolagen berkontribusi 70-80% dari berat kering kulit. Berdasarkan 28 jenis kolagen yang diketahui ada bukti bahwa 18 kolagen diekspresikan di kulit baik selama perkembangan atau pada orang dewasa. Hal ini mencerminkan pentingnya komposisi kolagen pada permukaan kulit.



Gambar 2.1. Ilustrasi skematis ekspresi dan lokalisasi kolagen individu di kulit⁴⁸

2.2.3. 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 sintesisnya⁴⁹. 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. Matriks metaloproteinase (MMP) disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas dan memecah kolagen dan protein lain yang terdapat pada matriks ekstraseluler 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*)^{50,51}.

2.2.4. 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 hidroksilisin⁵².

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 fibril⁵³.

Karena kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini. Sintesis dari protein penting ini meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada gambar 2.3⁵⁴:

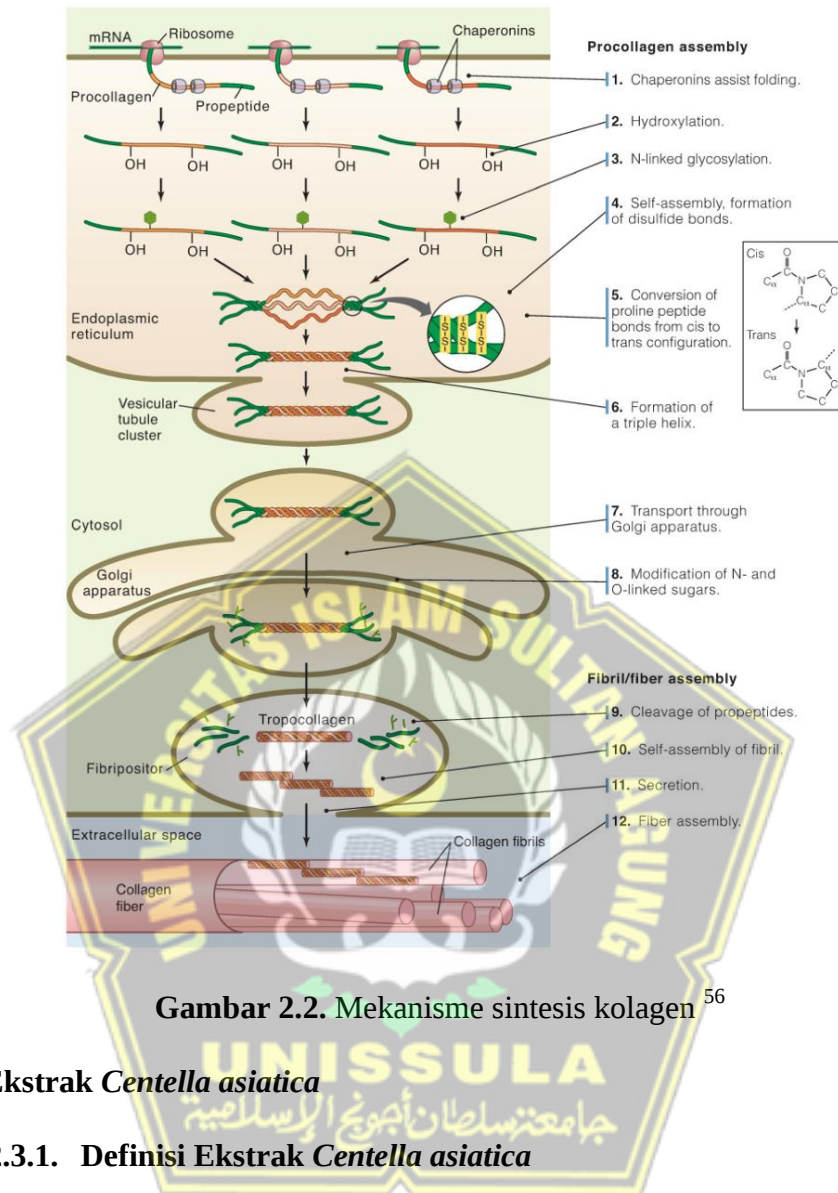
1. lipetida rantai prokolagen α diproduksi pada ikatan poliribosom yang berikatan dengan membrane dari Retikulum Endoplasma yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum 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 *Extracellular 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 ⁵⁵.

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. 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 ⁵⁶.



Gambar 2.2. Mekanisme sintesis kolagen⁵⁶

2.3. Ekstrak *Centella asiatica*

2.3.1. Definisi Ekstrak *Centella asiatica*

Pegagan (*Centella asiatica*), adalah tanaman tropis yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae*.⁵⁷ Taksonomi *Centella asiatica* adalah sebagai berikut :

1. Kingdom : Eukaryota
2. Subkingdom : Embryophyta
3. Division : Spermatophyta
4. Subdivision : Angiospermae

5. *Class : Dicotyledoneae*
6. *Subclass : Rosidae*
7. *Superorder : Aralianae*
8. *Order : Araliales (Umbelliflorae)*
9. *Family : Apiaceae atau Umbelliferae*
10. *Subfamily : Hydrocotyle*
11. *Genus : Centella*
12. *Species : Centella asiatica*⁵⁸



Gambar 2.3. Daun Pegagan⁵⁹

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 sitotoksik⁶⁰. 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 bebas⁶¹. *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 antiinflamasi⁵⁷.

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. Ketika *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*. Pegagan sebagai Antioksidan. *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 .

Baru-baru ini, *asam caffeoylquinic* muncul sebagai 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.

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 11,5⁶². 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 diyakini 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 (H_2) 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 diyakini 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^{20,22,23}

2.5. Pengaruh pemberian ekstrak *Centella asiatica* dan kombinasi air alkali terhadap ekspresi TGF- β dan densitas kolagen

Collagen loss yang ditandai dengan hilangnya elastisitas kulit dan peningkatan degradasi kolagen disebabkan oleh paparan sinar UVB⁶³. Mekanisme *collagen loss* pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan kerusakan sel keratinosit sehingga terjadi pembentukan ROS dan degradasi DNA¹². *Centella asiatica* diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid yang berperan sebagai antioksidan²⁴. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat produksi ROS dengan meningkatkan produksi enzim antioksidan pada kulit akibat paparan UVB sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen^{64,65}. Air alkali juga telah terbukti mengurangi 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 menginsukdi enzim antioksidan SOD, disisi lain air alkali selama 7 hari secara signifikan menurunkan ekspresi gen IL-1 β dan TNF- α ⁶⁶. Air alkali dengan dosis 10mL/kg berat badan tikus dapat membantu menjaga kolagen dengan mengurangi keasaman tubuh secara keseluruhan²⁰. *Centella asiatica* dan glikosida bioaktifnya mengaktifkan jalur TGF- β /Smad dengan meningkatkan kadar Smad3 terfosforilasi, meningkatkan level mRNA TGF- β 1 dan reseptor TGF- β II, serta menurunkan ekspresi Smad7 pada fibroblas⁶⁷. Triterpena dalam *Centella asiatica* merangsang produksi TGF- β 1, yang mengarah pada proliferasi fibroblas, sekresi matriks ekstraseluler, dan diferensiasi parsial menjadi miofibroblas¹⁶. Asam asiatik, komponen utama *Centella asiatica*, telah terbukti menghambat ekspresi kolagen yang diinduksi TGF- β 1 pada fibroblas keloid manusia, kemungkinan melalui aktivasi PPAR- γ . Asiatikosida, senyawa lain dari *Centella asiatica*, dapat menghambat transisi mesotelial-mesenkimal yang diinduksi TGF- β 1 dan pembentukan spesies oksigen reaktif, kemungkinan melalui aktivasi jalur antioksidan Nrf2/HO-1⁶⁸. Penurunan kadar ROS ini dapat meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 sehingga mengaktifasi ekspresi SMAD2/3. Kompleks SMAD2/3 berperan dalam produksi kolagen melalui induksi kolagen⁶⁹.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

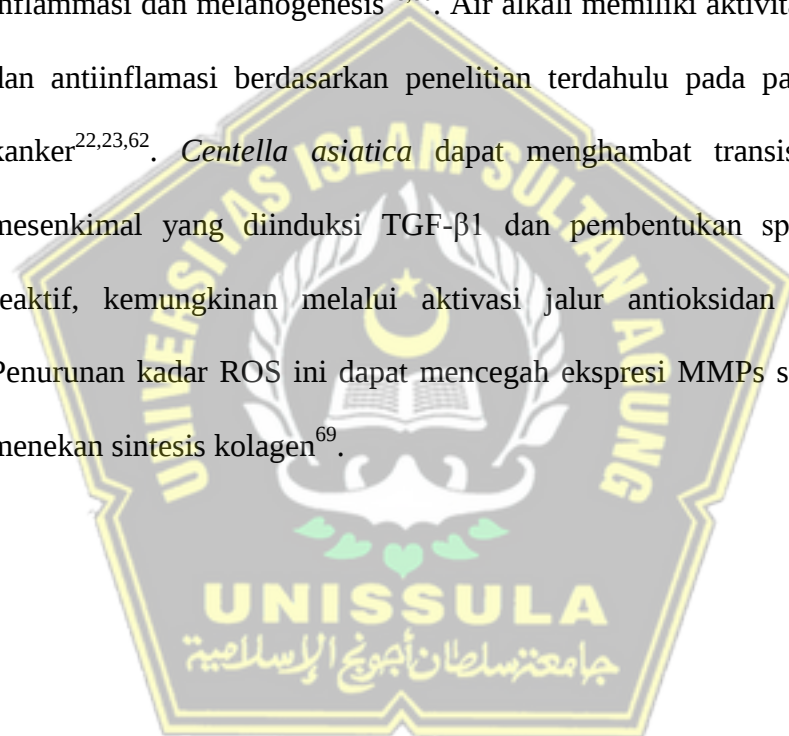
Penurunan kolagen yang ditandai dengan kerutan pada kulit dan hilangnya elastisitas kulit adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV⁶³. Mekanisme penurunan kolagen pada kulit akibat penetrasi UVB yang intens pada epidermis menghasilkan pembentukan ROS¹². Peningkatan kadar ROS yang berlebihan menginduksi kelebihan ROS intraseluler seperti oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) yang mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)⁷⁰. *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 c-Fos, p38 dan c-Jun *NH2-terminal kinase* (JNK) yang menstimulasi ekspresi c-Jun^{71,72}. Kombinasi c-Jun dengan c-Fos membentuk faktor transkripsi AP-1 yang memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi MMP-1 dan mengakibatkan penghambatan sintesis kolagen^{7,73}. Selain itu, AP-1 menghambat TGF- β yang merupakan pengatur utama produksi prokolagen pada kulit manusia sehingga menyebabkan penurunan sintesis prokolagen⁶. Selain AP-1, ROS juga menginduksi aktivasi transkripsi yang dimediasi NF- κ B dan regulasi ekspresi gen MMP-1. Aktivitas NF- κ B bertanggung jawab atas up-regulasi MMP-1 pada fibroblas dermal⁷⁴.

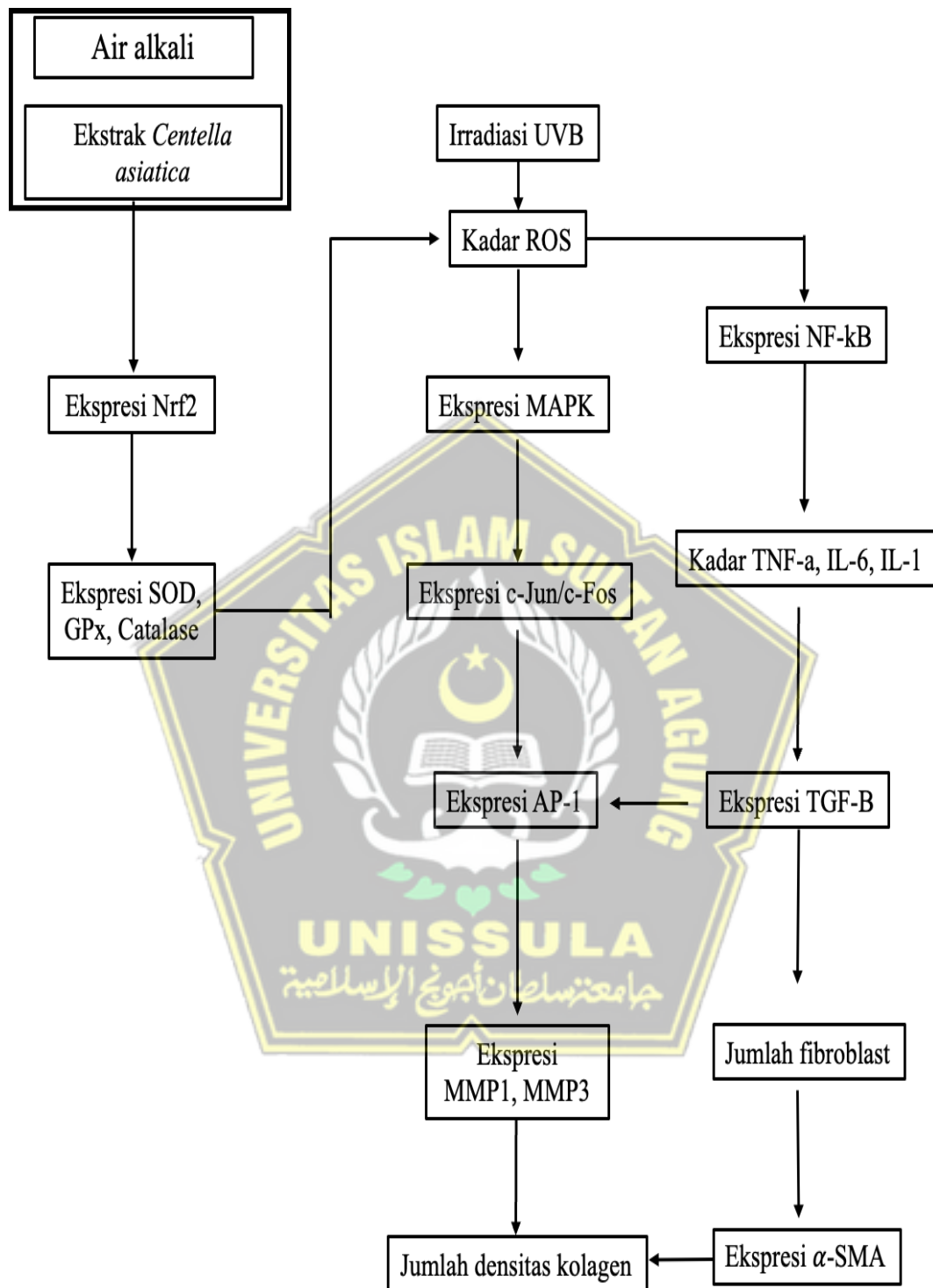
Aktivasi AP-1 yang diinduksi UV meningkatkan ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. Ketiga MMP tersebut mendegradasi sejumlah besar protein ECM, seperti kolagen tipe IV, V, IX, dan X, gelatin, fibrillin-1, fibronectin, laminin, dan proteoglikan. Fungsi utama MMP-3 adalah mengaktivasi pro-MMP seperti kolagenase, gelatinase B, dan matrilisin selama pergantian ECM. Produksi MMP-1 dan MMP-3 sangat penting untuk mengaktifkan sebagian pro-MMP-1⁷⁵⁻⁷⁷.

Dijalur yang lain peningkatan ROS juga mengaktifkan Mitogen Aktivated protein kinase (MAPK ekspresi protein kinase) yang mengakibatkan ekspresi NF- κ B memproduksi koenzim dan memicu sekresi sitokin inflamasi salah satunya interleukin (IL)-6, yang mengakibatkan overekspresi MMPs yang merupakan kolagenase terakumulasi pada kulit yang menua,⁷⁸ dan ekspresinya juga diaktifkan oleh faktor transkripsi protein-1 (AP-1) yang diaktifkan, yang terdiri dari c-Fos dan c-Jun. Degradasi kolagen diprakarsai oleh MMP-1 dan dilanjutkan oleh MMP-3. Kolagen memainkan peran utama dalam mempertahankan elastisitas kulit. Kolagen adalah protein struktural utama ECM dermal dan sintesis kolagen diinisiasi oleh TGF- β 1 melalui aktivasi kompleks smad2 dan smad3 yang berujung pada sintesis prokolagen sebagai prekursor kolagen⁷⁹.

Centella asiatica diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti flavonoid yang berperan sebagai antioksidan²⁴. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat produksi ROS dengan meningkatkan produksi enzim antioksidan pada kulit akibat paparan UVB

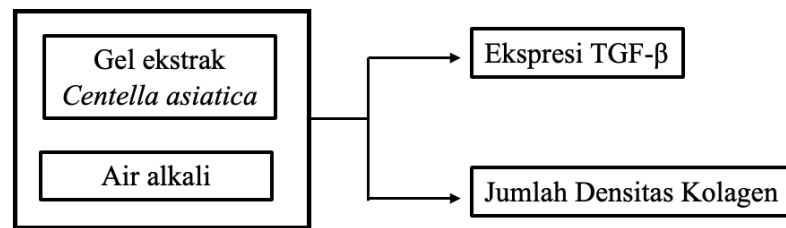
sehingga dapat mencegah terjadinya degradasi kolagen^{64,65}. Penurunan kadar ROS ini dapat meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 sehingga mengaktivasi ekspresi SMAD2/3. Kompleks SMAD2/3 berperan dalam produksi kolagen melalui induksi kolagen⁶⁹. Senyawa ekstrak *Cantella asiatica* juga menginduksi ekspresi SMAD2/3 sehingga menghambat aktivasi NF-kB yang dapat menekan pelepasan sitokin pro-inflammasi dan melanogenesis^{18,80}. Air alkali memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi berdasarkan penelitian terdahulu pada pasien penyakit kanker^{22,23,62}. *Centella asiatica* dapat menghambat transisi mesotelial-mesenkimal yang diinduksi TGF- β 1 dan pembentukan spesies oksigen reaktif, kemungkinan melalui aktivasi jalur antioksidan Nrf2/HO-1⁶⁸. Penurunan kadar ROS ini dapat mencegah ekspresi MMPs sehingga dapat menekan sintesis kolagen⁶⁹.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan air alkali secara oral terhadap ekspresi gen TGF-β dan jumlah densitas kolagen pada tikus jantan galur wistar model *collagen loss* yang diinduksi sinar UVB.

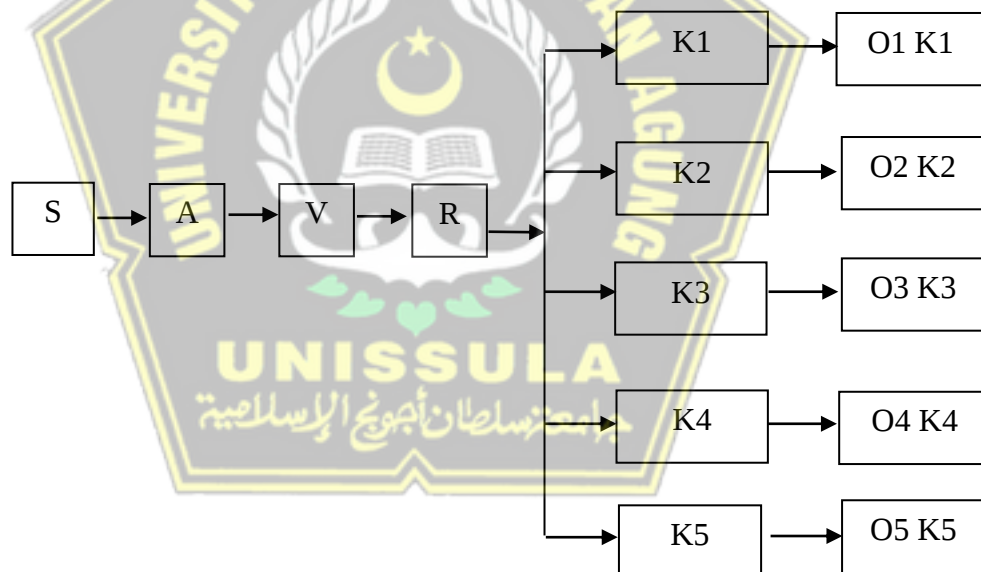


BAB IV

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: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang hanya dengan paparan UV dan 1 kelompok dengan HA (kontrol) dan 1 kelompok tikus sehat. 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.
- O : Observasi

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 TGF- β dan jumlah densitas kolagen

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 secara topikal dalam bentuk sediaan gel dengan dosis 10%. 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 TGF- β

Ekspresi gen TGF- β adalah rasio ekspresi gen *growth factor* pleiotropik yang mampu mengaktivasi fibroblas untuk memproduksi kolagen. TGF- β pada penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan kulit tikus yang diambil pada hari ke 15. Ekspresi gen TGF- β dianalisis dengan qRT-PCR yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH.

Satuan: Rasio mRNA level TGF- β /GAPDH.

Skala: rasio

4.2.2.4. Jumlah densitas kolagen

Jumlah densitas kolagen adalah jumlah protein matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblast yang

teraktivasi pada hari 15 setelah awal pemberian perlakuan dan berwarna biru pada pengecatan Masson Trichome. Metode penghitungan kolagen menggunakan aplikasi computer ImageJ.

Satuan: persen jumlah kolagen

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 minggu⁸¹.

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 minggu ⁸¹ 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

Pelitian 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 TGF- β , primer GAPDH, dan masson trichome staining.

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 ethanol 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*⁸²

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 lima 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 minggu⁸¹ 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. 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.

4.5.6. Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi

Masukan potongan jaringan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Masukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam paraffin setebal 4 mikron dengan mikrotom. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Masukan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58oC hingga parafin mencair.

4.5.7. Pengecatan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan Masson Trichome⁸³ 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

4.5.8. Analisis Kuantitatif Ekspresi TGF- β dan Densitas Kolagen menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁸⁴ 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 TGF- β 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 TGF- β 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.

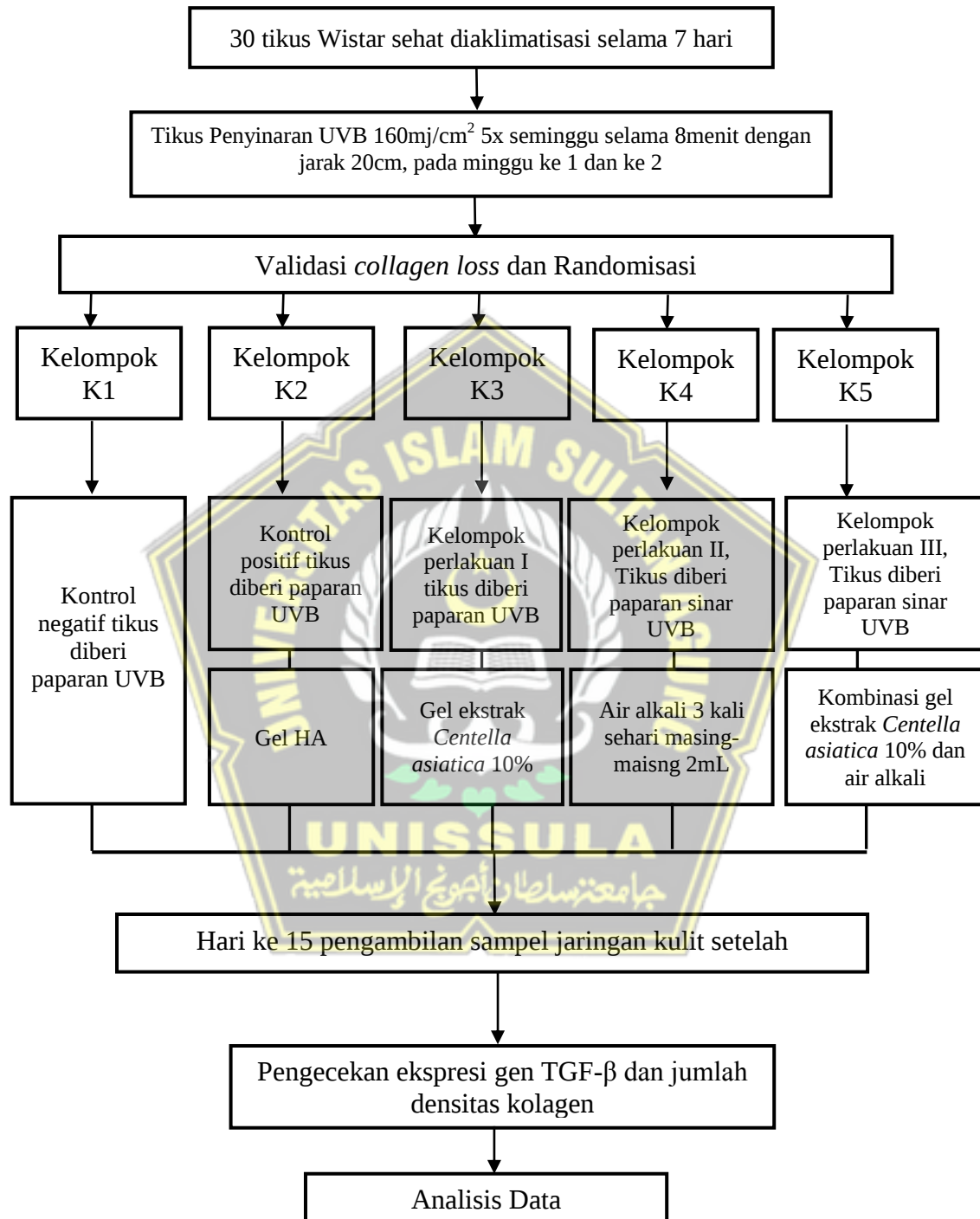
4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Pada data ekspresi gen TGF- β diperoleh data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$) maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua

kelompok penelitian, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Pada data densitas kolagen didapatkan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Hasil uji beda *one Way ANOVA* dengan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

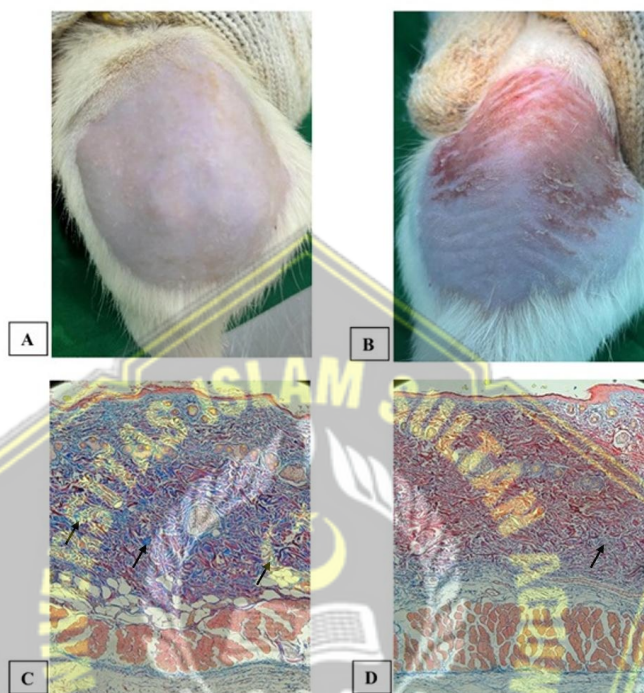
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilaksanakan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang selama periode November sampai Desember 2024. Studi ini menggunakan tikus wistar jantan sebagai model *collagen loss*, dengan paparan UVB 302 nm pada dosis 160 mJ/cm² selama kurang lebih 8 menit per hari dengan jarak 20cm, yang dilakukan 5 kali dalam seminggu selama 2 minggu. Studi ini membagi subjek ke dalam 5 kelompok eksperimen: kelompok kontrol negatif; kelompok kontrol positif yang diberi gel hyaluronic acid (HA) 200mg; kelompok eksperimen pertama yang menerima gel ekstrak daun pegagan 10% (EDP 10%); kelompok eksperimen kedua yang diberi air alkali secara oral sebanyak 2ml tiga kali sehari; dan kelompok eksperimen ketiga yang menerima kombinasi gel EDP 10% dan air alkali oral 2ml tiga kali sehari. Sebelum pelaksanaan penelitian utama, dilakukan validasi *collagen loss* yang membuktikan bahwa paparan UVB dengan dosis tersebut efektif menginduksi *collagen loss*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian EDP 10%, baik sendiri maupun dikombinasikan dengan air alkali, berhasil meningkatkan kadar TGF- β dan persentase densitas kolagen.

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 mewarnai kolagen dilakukan pada hari ke 15 untuk melihat

adanya *collagen loss* akibat paparan UVB. Hasil pengamatan terlihat adanya *collagen loss* pada tikus yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar (Gambar 5.1 C-D).



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

Ekstraksi daun pegagan pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen sebesar 8,09%. Ekstrak daun pegagan mengandung beberapa golongan senyawa bioaktif berdasarkan hasil analisis fitokimia secara kualitatif, yang meliputi alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Peneliti menggunakan metode spektrofotometri untuk melakukan analisis kuantitatif kandungan flavonoid dan fenolik total dalam ekstrak daun pegagan. Setiap gram ekstrak daun pegagan mengandung flavonoid sebanyak $30,89 \text{ mg} \pm 0,98$ dan senyawa fenolik sebanyak $60,55 \text{ mg} \pm 0,55$

berdasarkan hasil pengukuran. Flavonoid terbukti menjadi salah satu komponen utama dalam ekstrak daun pegagan berdasarkan data tersebut. Ekstrak daun pegagan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 11,59 mg/mL berdasarkan hasil pengujian antioksidan.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Efek Pemberian Kombinasi Gel Ekstrak Daun Pegagan dan Air

Alkali terhadap ekspresi gen TGF- β

Penelitian kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali terhadap ekspresi gen TGF- β pada tikus galur wistar yang di induksi paparan sinar UVB dianalisis pada hari ke-29. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Non Parametrik pada Ekspresi Gen TGF- β

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Ekspresi gen TGF-β	0,00036	0,00048	0,00055	0,00080	0,00137	
Mean	0,00002	0,00013	0,00004	0,00011	0,00080	
Std.deviasi						
<i>Shapiro Wilk</i>	0,175*	0,001	0,723*	0,006	0,001	
<i>Levene test</i>						0,005
<i>Kruskall Wallis</i>						0,001***
Keterangan:	*Normal $p>0,05$ **Homogen $p>0,05$ ***Signifikan $p<0,05$					

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi gen TGF- β tertinggi pada kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali sebesar $0,00137 \pm 0,00080$. Diikuti oleh kelompok

pemberian tunggal air alkali dengan nilai ekspresi gen TGF- β sebesar $0,00080 \pm 0,00011$. Kelompok pemberian tunggal ekstrak daun pegagan 10% juga terlihat meningkatkan ekspresi gen TGF- β hingga $0,00055 \pm 0,00004$. Pada kelompok kontrol positif HA mengalami sedikit peningkatan ekspresi gen TGF- β sebesar $0,00048 \pm 0,00013$. Kelompok kontrol negatif memiliki ekspresi gen TGF- β terendah yaitu $0,00036 \pm 0,00002$. Seluruh kelompok rerata ekspresi gen TGF- β berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi tidak dengan nilai *p-value* $<0,05$ pada kelompok kontrol positif dan kelompok pemberian tunggal air alkali. Hasil uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang tidak homogen dengan nilai *p-value* 0,005 ($p < 0,05$). Sebaran data yang 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* 0,001 ($p < 0,05$). Hasil signifikan pada uji *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

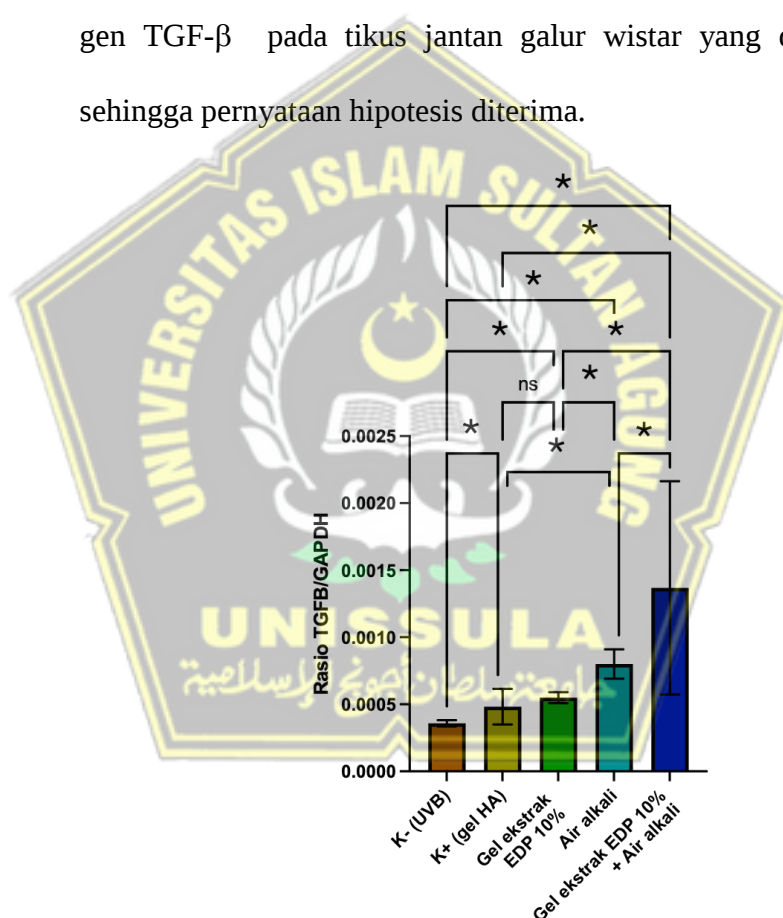
Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi Gen TGF- β antara kelompok penelitian dengan uji Mann Whitney

Kelompok	Kelompok perbandingan	<i>p-Value</i>
K1	K2	0,002*
	K3	0,002*
	K4	0,002*
	K5	0,002*
K2	K3	0,065
	K4	0,010*
	K5	0,004*
K3	K4	0,002*
	K5	0,002*
K4	K5	0,009*

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

Hasil uji *mann whitney* ekspresi gen TGF- β pada tabel 5.2 menunjukkan ekspresi gen TGF- β pada kelompok tikus kontrol negatif UVB terdapat perbedaan signifikan terhadap semua kelompok penelitian. Hasil uji *mann whitney* menunjukkan bahwa hanya pada kelompok kontrol positif HA terhadap kelompok pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% yang tidak memiliki perbedaan secara signifikan. Pada kelompok penelitian lainnya memiliki perbedaan yang signifikan satu dengan yang lainnya. Hasil ekspresi TGF- β tertinggi pada kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dan ekspresi gen TGF- β terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif yang dipapar sinar UVB. Hasil ekspresi gen TGF- β pada kelompok pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% dan kelompok kontrol positif HA adalah sama. Pemberian air alkali secara tunggal meningkatkan ekspresi gen TGF- β lebih besar dari kelompok kontrol positif HA

dan kelompok pemberian tunggal daun pegagan 10%, namun secara keseluruhan semua kelompok penelitian dapat meningkatkan ekspresi gen TGF- β dibandingkan kelompok kontrol UVB. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian pemberian gel HA, gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal dan kombinasi dengan air alkali berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen TGF- β pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.2. Ekspresi gen TGF- β 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 Jumlah Densitas Kolagen

Rerata persentase jumlah densitas kolagen mengalami peningkatan tertinggi persentase jumlah densitas kolagen pada pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali sebesar $47,39 \pm 6,14$. Pada kelompok perlakuan lainnya memiliki persentase jumlah densitas kolagen yang juga meningkat, pada kelompok kontrol positif HA memiliki jumlah densitas kolagen sebesar $39,76 \pm 7,74$, selanjutnya kelompok pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan memiliki densitas kolagen sebesar $25,94 \pm 2,28$, dan pada kelompok tunggal pemberian air alkali sebesar $21,19 \pm 1,75$. Kelompok kontrol negatif yang hanya di papar sinar UVB memiliki persentase jumlah densitas kolagen sebesar $15,32 \pm 5,72$ (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Beda Parametrik pada jumlah densitas kolagen

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
Jumlah densitas kolagen						
Mean	15,32	39,76	25,94	21,19	47,39	
Std.deviasi	5,71	7,74	2,28	1,75	6,14	
Shapiro Wilk	0,678*	0,968*	0,175*	0,423*	0,770*	
Levene test						0,055**
One Way ANOVA						0,001***
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$						

Seluruh kelompok persentase jumlah densitas kolagen berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai *p*-

value >0,05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *lavene test* diperoleh hasil data yang homogen dengan nilai *p-value* 0,055 ($p>0,05$). Sebaran data normal dan homogen maka analisis data menggunakan uji parametrik *one way ANOVA*. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian dengan nilai *p-value* 0,001 ($p<0,05$). Hasil signifikan pada uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda signifikan.

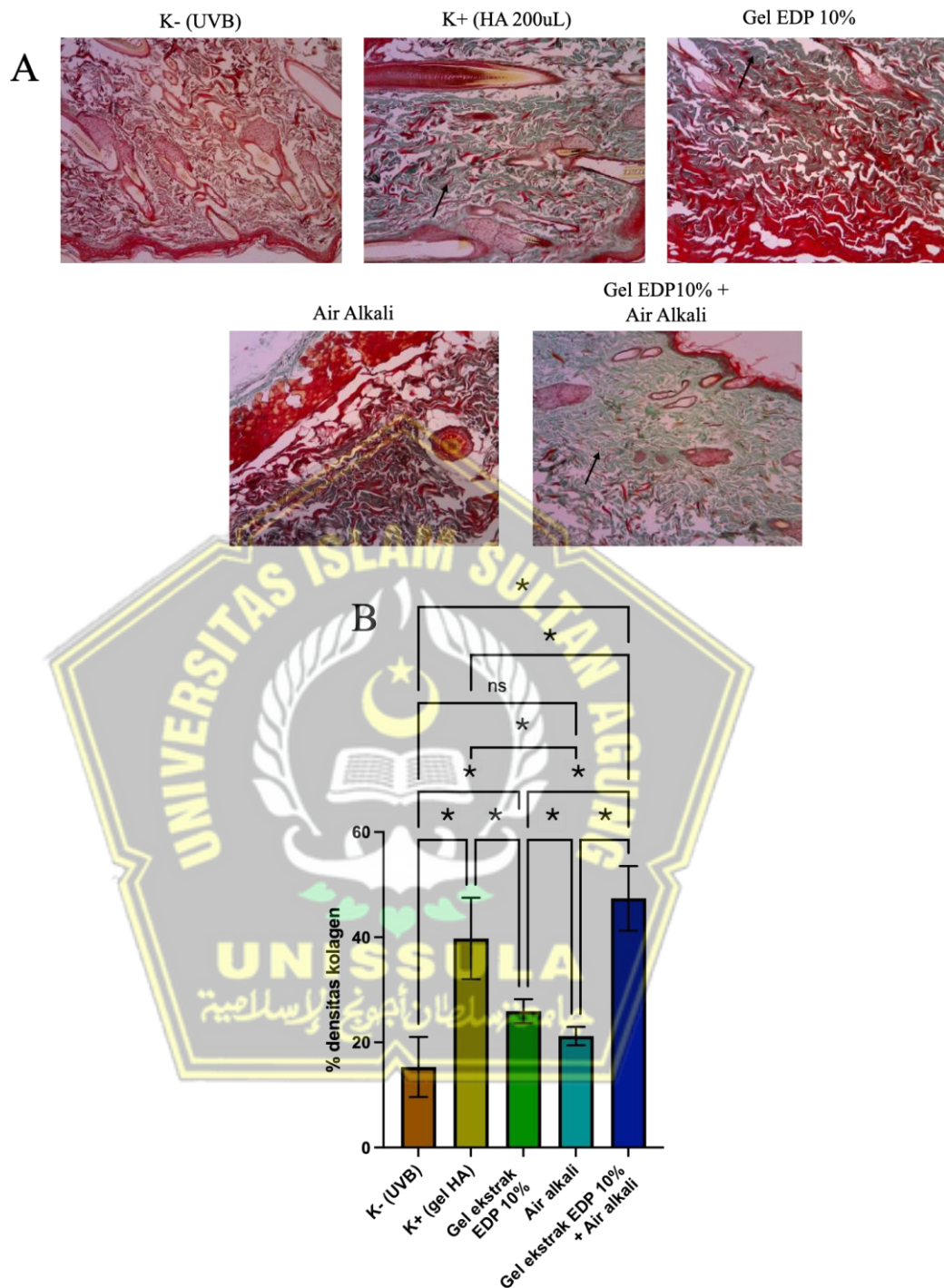
Tabel 5.4. Perbedaan kadar jumlah densitas kolagen antara kelompok penelitian dengan uji *Post hoc LSD*

Kelompok	Kelompok perbandingan	<i>p-Value</i>
K1	K2	0,001*
	K3	0,002*
	K4	0,065
	K5	0,001*
K2	K3	0,001*
	K4	0,001*
	K5	0,019*
K3	K4	0,131
K4	K5	0,001*
	K5	0,001*

*Uji *Post hoc LSD* dengan nilai signifikan $p<0,05$

Hasil uji *post hoc LSD* pada tabel 5.4 menunjukkan persentase jumlah kolagen pada kelompok tikus kontrol negatif yang dipapar sinar UVB tanpa perlakuan terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% tunggal, kelompok kontrol positif HA, dan kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali. Kelompok kontrol negatif UVB tidak berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok pemberian tunggal air alkali. Hasil persentase jumlah densitas

kolagen tertinggi pada kelompok kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dan jumlah densitas kolagen terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif yang dipapar sinar UVB. Hasil persentase jumlah densitas kolagen pada kelompok pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% dan kelompok air alkali tunggal adalah hampir mirip. Pemberian gel HA meningkatkan persentase jumlah densitas kolagen lebih besar dari kelompok kontrol tunggal air alkali dan kelompok pemberian tunggal daun pegagan 10%, namun secara keseluruhan kelompok penelitian gel ekstrak daun pegagan 10%, gel HA, dan kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali dapat meningkatkan persentase jumlah densitas kolagen secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol UVB kecuali pada kelompok tunggal air alkali tidak berbeda secara signifikan. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi gel ekstrak daun pegagan 10% dan air alkali berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan persentase jumlah kolagen pada tikus jantan galur wistar yang disinari UVB, sehingga pernyataan hipotesis diterima.



Gambar 5.3. (A) Makroskopis pewarnaan kolagen pada kelompok penelitian dengan pewarnaan masson trichome. (B) Persentase jumlah densitas kolagen 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

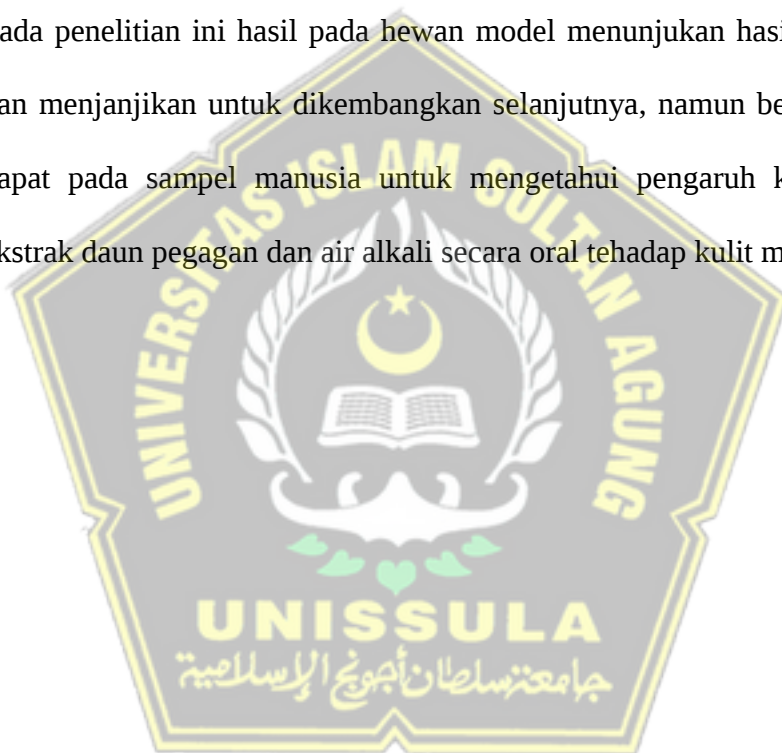
Penurunan kolagen yang ditandai dengan kerutan pada kulit dan hilangnya elastisitas kulit adalah kelainan kulit kronis yang disebabkan oleh paparan sinar UV⁶³. Ekspresi *growth factor* TGF- β yang mempengaruhi pembentukan α -SMA untuk menginduksi sintesis kolagen mengalami penurunan saat kondisi pro-inflamasi akibat paparan sinar UVB⁸⁵. Paparan sinar UVB berlebihan menginduksi munculnya stress pada kulit yang ditandai dengan peningkatan kadar ROS⁸⁶. Stres oksidatif memulai kaskade jalur pensinyalan, dengan menginduksi protein aktivator 1 (AP-1) dan *down-regulation* TGF- β , diikuti oleh hambatan ekspresi α -SMA dan penghambatan sintesis kolagen⁸⁷. Peningkatan ROS yang berlebihan juga akan mengaktifasi jalur protein kinase yang kemudian memicu peningkatan produksi enzim MMP yang disekresikan oleh neutrofil untuk mendegradasi kolagen⁷⁴. Pemberian senyawa antioksidan kuat yang dapat menurunkan kondisi stress oksidatif akibat paparan sinar UVB sehingga menunjukkan efek perbaikan kolagen yang baik pada kulit sangat diperlukan. Penurunan stres oksidatif paparan sinar UVB akut dapat dicegah dengan berbagai senyawa yang mampu menyeimbangkan radikal seperti senyawa bahan alam yang mengandung flavonoid, alkaloid, terpenoid, maupun saponin⁸⁸. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak daun pegagan 10% secara tunggal maupun dikombinasi dengan air alkali dapat secara signifikan meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan persentase jumlah kolagen pada tikus model yang mengalami *colagen loss*.

Daun pegagan memiliki senyawa aktif salah satunya adalah flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan triterpenoid dimana berperan sebagai antioksidan dan anti inflamasi, sehingga mampu berperan dalam menekan stress oksidatif yang dapat menginduksi produksi TGF- β dan kolagen⁸⁹⁻⁹². Senyawa flavonoid yang berasal dari ekstrak daun pegagan mungkin dapat mengaktifkan jalur PI3K melalui jalur TGF- β yang melibatkan TGF- β reseptor I dan II. Aktivasi PI3K akan mengaktifkan Akt yang berdampak pada aktivasi mTOR. mTOR yang aktif akan menginduksi ekspresi SMAD2/3 yang berujung pada aktivasi SMAD2/3. SMAD2/3 yang dilepaskan memicu pelepasan α -SMA sehingga terjadi perubahan fibroblast menjadi myofibroblast yang berujung pada induksi kolagen⁸⁸. Aktivitas ini didukung secara sinergi dengan pemberian air alkali, dimana berdasarkan penelitian sebelum dilaporkan bahwa pH basa pada air alkali dapat meningkatkan stabilitas matriks ekstraselular kulit dengan mencegah degradasi ECM²⁰. Penelitian lain juga memperkuat efek sinergis ini dimana terbukti bahwa air alkali memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dengan menekan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B^{22,23,62}. *Centella asiatica* juga dapat menghambat transisi mesotelial-mesenkimal yang diinduksi TGF- β 1 dan pembentukan ROS melalui aktivasi jalur antioksidan Nrf2/HO-1⁶⁸. Penurunan kadar ROS ini dapat mencegah ekspresi MMPs sehingga dapat menekan degradasi kolagen⁶⁹.

Pada penelitian ini pemberian tunggal gel ekstrak daun pegagan 10% juga memiliki aktivitas yang lebih baik dalam meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan jumlah densitas kolagen dibandingkan pemberian tunggal air alkali, hal ini dimungkinkan karena ekstrak daun pegagan selain memiliki aktivitas antioksidan juga memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Ekstrak daun pegagan dapat bekerja melalui berbagai mekanisme, sedangkan penelitian sebelumnya melaporkan bahwa air alkali kebanyakan bersifat antioksidan saja ²⁰. Ekstrak daun pegagan juga menginduksi ekspresi SMAD2/3 sehingga menghambat aktivasi NF-kB yang dapat menekan pelepasan sitokin pro-inflammasi ^{18,80}. Penelitian terdahulu melaporkan senyawa flavonoid menginduksi peningkatan kadar SOD melalui ikatan hidrogen dengan Ser212 melalui gugus 3'-OH menyebabkan penghambatan aktivitas protein kinase kinase (MEK1). Flavonoid juga menghambat aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan mengaktifasi protein kinase (MAPK) untuk menginduksi ekspresi enzim antioksidan SOD⁸⁸. Hasil penelitian ini konsisten dengan temuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan dapat menekan berbagai menginduksi *growth factor* dan *mencegah inflamasi* ⁶⁷. Hasil penelitian ini secara keseluruhan membuktikan juga bahwa pemberian air alkali tunggal dapat meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan densitas kolagen, namun bila dikombinasikan dengan ekstrak daun pegagan semakin memperkuat efeknya dan memiliki efek yang secara signifikan sinergis. Temuan ini membuka perspektif baru dalam pengembangan sediaan topikal untuk perbaikan kolagen loss dengan

potensi aplikasi yang lebih luas dalam penanganan kondisi inflamasi kulit lainnya.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak dilakukan analisis jalur pensinyalan yang berkaitan dengan ekspresi gen TGF- β dan produksi kolagen pada penelitian ini seperti analisis a-SMA dan SMAD yang merupakan downstream jalur TGF- β yang terkait dengan produksi kolagen. Pada penelitian ini hasil pada hewan model menunjukkan hasil yang positif dan menjanjikan untuk dikembangkan selanjutnya, namun belum memiliki dapat pada sampel manusia untuk mengetahui pengaruh kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali secara oral terhadap kulit manusia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun Pegagan pada dosis 10% dan kombinasi air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap kadar peningkatan ekspresi gen TGF- β pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.
2. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal ekstrak Daun Pegagan pada dosis 10% kombinasi air alkali secara oral 3 kali 2 ml dalam sehari terhadap peningkatan jumlah densitas kolagen pada tikus wistar model *collagen loss* yang dipapar sinar UVB.

6.2. Saran

1. Analisis jalur pensinyalan yang berkaitan dengan ekspresi gen TGF- β dan produksi kolagen pada penelitian ini belum dilakukan, penelitian selanjutnya dapat menganalisis ekspresi α -SMA dan SMAD yang terkait dengan korelasi produksi kolagen.
2. Penelitian dapat dilanjutkan pada fase klinis untuk mengetahui pengaruh kombinasi gel ekstrak daun pegagan dan air alkali secara oral terhadap kulit manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 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.
- 2 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.
- 3 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.
- 4 Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/4350965.
- 5 Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/3565127.
- 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 García-Gavín J, González-Vilas D, Fernández-Redondo V, Toribio J. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis* 2010; **62**: 63–64.
- 9 Baliña LM, Graupe K. The Treatment of Melasma 20% Azelaic Acid versus 4% Hydroquinone Cream. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 893–895.
- 10 Sarkar R, Bhalla M, Kanwar AJ. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatology* 2002; **205**: 249–254.
- 11 Pamudji R. Hubungan Tingkat Pendidikan dengan Pengetahuan Pekerja di Palembang Mengenai Penggunaan Tabir Surya. 2017.

- 12 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.
- 13 Shi R, Gao S, Smith AH, Li H, Shao M, Shangguan J *et al.* Superoxide-induced Type I Collagen Secretion Depends on Prolyl 4-Hydroxylases. 2021. doi:10.1016/j.bbrc.2020.07.002.Superoxide-induced.
- 14 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.

- 22 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.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 Federico Ebau ASMLMMMVCMPGE. Ekstrak Centella Asiatica-nonokomposit SiO₂ : Lebih dari sekedar sistem Penghantar Obat Untuk Perlindungan Kulit Dari Kerusakan Oksidatif . 2022.
- 26 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.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 Gong D, Shi W, Yi S ju, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol* 2012; **13**. doi:10.1186/1471-2172-13-31.
- 30 Moon HR, Jung JM, Kim SY, Song Y, Chang SE. TGF-β3 suppresses melanogenesis in human melanocytes cocultured with UV-irradiated neighboring cells and human skin. *J Dermatol Sci* 2020; **99**: 100–108.
- 31 Liu M, Yang SC, Sharma S, Luo J, Cui X, Peebles KA *et al*. EGFR signaling is required for TGF-β1-mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; **37**: 578–588.

- 32 Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxid Med Cell Longev* 2015; **2015**. doi:10.1155/2015/654594.
- 33 Baillie R, Coombes RC, Smith J. Multiple forms of TGF- β 1 in breast tissue: A biologically active form of the small latent complex of TGF- β 1. *European Journal of Cancer Part A* 1996; **32**: 1566–1573.
- 34 Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y *et al*. Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.
- 35 Lai XN, Li J, Tang LB, Chen WT, Zhang L, Xiong LX. Mirnas and lncRNAs: Dual roles in TGF- β signaling-regulated metastasis in lung cancer. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21041193.
- 36 Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen* 2016; **24**: 215–222.
- 37 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al*. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 38 Murakami M, Matsuzaki F, Funaba M. Regulation of melanin synthesis by the TGF- β family in B16 melanoma cells. *Mol Biol Rep* 2009; **36**: 1247–1250.
- 39 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *et al*. The role of tn α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; **6**: 1779–1783.
- 40 Pan T, Xu J, Zhu Y. Self-renewal molecular mechanisms of colorectal cancer stem cells. *Int J Mol Med* 2017; **39**: 9–20.
- 41 Li L, Ngo HTT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J *et al*. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21010049.

- 42 Feng Y, Wu JJ, Sun ZL, Liu SY, Zou ML, Yuan ZD *et al.* Targeted apoptosis of myofibroblasts by elesclomol inhibits hypertrophic scar formation. *EBioMedicine* 2020; **54**: 102715.
- 43 Tan J, Wu J. Current progress in understanding the molecular pathogenesis of burn scar contracture. *Burns Trauma* 2017; **5**: 1–6.
- 44 Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* 2007; **179**: 1311–1323.
- 45 Sapudom J, Wu X, Chkolnikov M, Ansorge M, Anderegg U, Pompe T. Fibroblast fate regulation by time dependent TGF- β 1 and IL-10 stimulation in biomimetic 3D matrices. *Biomater Sci* 2017; **5**: 1858–1867.
- 46 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 47 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
- 48 Zhang JA, Yin Z, Ma LW, Yin ZQ, Hu YY, Xu Y *et al.* The protective effect of baicalin against UVB irradiation induced photoaging: An in vitro and in vivo study. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0099703.
- 49 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.
- 50 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.
- 51 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.
- 52 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.
- 53 Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1341–1353.

- 54 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.
- 55 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 56 Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
- 57 Sutardi S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 2017; **35**: 121.
- 58 Zahara K. Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. *Pure and Applied Biology* 2014; **3**: 152–159.
- 59 max rank. Daun Pegagan: Kandungan dan Manfaatnya bagi Kesehatan . <https://umsu.ac.id/health/daun-pegagan-kandungan-dan-manfaatnya-bagi-kesehatan/> 2024.
- 60 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>.
- 61 Citra Nur Mutiarahmi dkk. Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan. 2023.
- 62 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.
- 63 Wölfl 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.
- 64 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.
- 65 Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013; **53**: 401–426.
- 66 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.
- 67 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.
 - 68 Jatayu D, Nursyam H, Maizar Suryanto Hertika A. Antioxidant Effect of Centella asiatica Ethanolic Extract to Superoxide Dismutase (SOD) Level on Cyprinus carpio Liver. *Research Journal of Life Science* 2018; **5**: 163–172.
 - 69 Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D *et al.* Impact of Ultraviolet Radiation on Expression of Transforming Growth Factor-beta, Smad2, Metalloproteinases, Cathepsin K and Progerin. *Int J Lab Hematol* 2016; **38**: 42–49.
 - 70 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.
 - 71 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.
 - 72 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.
 - 73 Chan ZCK, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett* 2020; **724**: 134822.
 - 74 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.
 - 75 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.

- 76 Im NK, Jang WJ, Jeong CH, Jeong GS. Delphinidin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the NF- κ B activation through MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Med Food* 2014; **17**: 855–861.
- 77 Taparia SS, Khanna A. Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2016; **83**: 130–140.
- 78 Gomes KB. IL-6 and type 1 diabetes mellitus: T cell responses and increase in IL-6 receptor surface expression. *Ann Transl Med* 2017; **5**: 16–18.
- 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 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.
- 81 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.
- 82 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.
- 83 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.
- 84 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.
- 85 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.

- 86 Ismardianita E, Elianora D, Rosalina W, Nofriker L, Khairani VY. The effectiveness methanol extract clausena excavate on number of fibroblast and density of collagen fibers after tooth extraction. 2019; **4**: 170–175.
- 87 Seol JE, Ahn SW, Seol B, Yun HR, Park N, Kim HK *et al.* Echinochrome A Protects against Ultraviolet B-induced Photoaging by Lowering Collagen Degradation and Inflammatory Cell Infiltration in Hairless Mice. 2021.
- 88 Brunetti C, di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *Int J Mol Sci.* 2013; **14**: 3540–3555.
- 89 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 2016; **5**. doi:10.1017/jns.2016.41.
- 90 Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA, Savarimuthu I. Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* 2017. doi:10.5772/68095.
- 91 Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci* 2018; **208**: 111–122.
- 92 Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 2014; **23**: 239–244.
- 93 Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., 2010, pp 120–125.
- 94 Schneider LA, Raizner K, Wlaschek M, Brenneisen P, Gethöffer K, Scharffetter-Kochanek K. UVA-1 exposure in vivo leads to an IL-6 surge within the skin. *Exp Dermatol* 2017; **26**: 830–832.
- 95 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.
- 96 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.
- 97 Chen E, Liu G, Zhou X, Zhang W, Wang C, Hu D *et al.* Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *FASEB Journal* 2018; **32**: 4917–4929.

- 98 Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; **16**: 4277–4283.
- 99 Grande R, Pacella S, Di Giulio M, Rapino M, Di Valerio V, Cellini L *et al*. NF- κ B mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/*Streptococcus mutans* co-cultured cells. *Clin Oral Investig* 2015; **19**: 841–849.

