

PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SMAD4 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I

(Studi Experimental pada Tikus *Wistar* yang Dipapar UVB)

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Azky Noor Fadhilla Surachman

NIM: MBK.23.22.010382

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

2025

TESIS

PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SMAD4 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I (Studi Experimental pada Tikus *Wistar* yang Dipapar UVB)

disusun oleh:

Azky Noor Fadhilla Surachman


MBK.23.22.010382

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 6 November 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. dr. Prasetyadi Mawardi Sp. DVE,
Subsp. Ven., FINS DV, FAADV
NIP : 196112101990031005


Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF
NIK : 210199049

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



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, November 2025

Azky Noor Fadhilla Surachman







LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis Dengan Judul “PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SMAD4 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang dipapar sinar UVB)” ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 6 November 2025

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1	Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. DVE, Subsp.D.K.E, FINS DV FAADV	Penguji I	
2	Prof. Dr. Dra. Atina Hussana, M. Si. Apt	Penguji II	
3	Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes	Penguji III	
4	Dr. dr. Prasetyadi Mawardi Sp. DVE., Subsp.Ven., FINS DV, FAADV	Pembimbing I	
5	Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH,Sp.KF	Pembimbing II	

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Azkya Noor Fadhilla Surachman
Tempat / tanggal lahir : Tasikmalaya, 5 Agustus 1991
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK PGRI Cipakat : Lulus tahun 1998
2. SDN Sukasenang 2 : Lulus tahun 2004
3. SMPN 1 Singaparna : Lulus tahun 2007
4. SMAN 2 Tasikmalaya : Lulus tahun 2010
5. S1 Fakultas Kedokteran UMY : Lulus tahun 2014
6. Profesi Dokter UMY : Lulus tahun 2016
7. Magister Ilmu Bomedik FK Unissula : (2023 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

Nama Suami : Handa Meru Erio Rakihara
Nama Anak : Muhammad Arjuna Xavier Azraki
Airlangga Ahmad Hafeezy Azraki

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT sehingga tesis penulisan berjudul **“PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SMAD4 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE 1 (Studi Experimental pada Tikus Wistar yang Dipapar UVB)** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai Gelar Magister Ilmu Biomedik Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, 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 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
4. Dr. dr. Prasetyadi Mawardi Sp.DVE., Subsp.Ven., FINS DV, FAADV selaku dosen pembimbing I atas waktu, ilmu, bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan naskah tesis ini.
5. Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF selaku dosen pembimbing II atas kesabaran, ilmu dan nasihat serta motivasi yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan naskah tesis ini.

6. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE, Subsp.D.K.E, FINSADV, FAADV selaku penguji I, yang telah memberi nasihat, saran dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
7. Prof. Dr. Dra. Atina Hussana, M.Si. Apt selaku penguji II, yang telah memberi nasihat, saran dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji III, yang telah memberi nasihat, saran dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
9. Seluruh pegawai dan dokter di Laboratorium Farmasi, IBL Universitas Islam Sultan Agung yang telah terlibat dalam proses penelitian ini dan telah bekerjasama dan kontribusi dalam proses penelitian ini.
10. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
11. Keluarga kecil dan segenap Keluarga besar yang tidak pernah putus mendo'akan dan memberikan dukungan Moril dan Materiil serta memberikan warna dalam kehidupan penulis.
12. Teman-teman dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, saya ucapkan terimakasih banyak atas dukungannya selama ini.

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.

Semarang, November 2025

Azky Noor Fadhilla Surachman



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI.....	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.3.1. Tujuan Umum	2
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1. Manfaat Teoritis	3
1.4.2. Manfaat Praktis	3
1.5. Originalitas Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Paparan UVB pada kulit.....	10
2.1.1. Anatomi Kulit	10
2.1.2. <i>Skin Damage</i> (Kerusakan Kulit).....	11
2.2. Ekspresi dan Aktivitas Protein SMAD	14
2.2.1. TGF- β	14

2.2.2.	Proses Biosintesis oleh <i>Extracellular Matrix Production</i> (Peran Kolagen tipe I).....	15
2.2.3.	Jalur Sinyal TGF- β	17
2.2.4.	Faktor yang Mempengaruhi Sinyal TGF- β jalur SMAD.....	19
2.2.5.	Metode Pengukuran Sinyal TGF- β jalur SMAD	21
2.3.	Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	23
2.3.1.	Definisi dari Tanaman <i>Centella asiatica</i>	23
2.3.2.	Toksonomi dan Sitematika <i>Centella asiatica</i>	24
2.3.3.	Ekstrak <i>Centella asiatica</i> (pegagan)	25
2.3.4.	Proses Ekstrak Daun <i>Centella asiatica</i> menjadi krim 5% dan 10 %.....	29
2.3.5.	Toksisitas Ekstrak Daun <i>Centella asiatica</i>	30
2.3.6.	Pengaruh Ekstrak <i>Centella asiatica</i> terhadap Protein SMAD pada Kerusakan Kulit	31
2.4.	Tikus <i>Wistar</i> sebagai Hewan Uji	33
2.4.1.	Karakteristik Tikus <i>Wistar</i> sebagai Hewan Uji.....	33
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		36
3.1.	Kerangka Teori	36
3.2.	Kerangka Konsep	40
3.3.	Hipotesis	40
BAB IV METODE PENELITIAN.....		41
4.1.	Jenis Penelitan dan Rancangan Penelitian.....	41
4.2.	Populasi Penelitian dan Sampel Penelitian.....	42
4.2.1.	Teknik Pengambilan Sampel	42
4.2.2.	Kriteria Sampel.....	43
4.3.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	44
4.3.1.	Variabel penelitian	44
4.3.2.	Definisi Operasional	44
4.4.	Alat dan Bahan	46
4.4.1.	Alat	46
4.4.2.	Bahan	47

4.5. Cara Penelitian.....	47
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	47
4.5.2. Preparasi Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	48
4.5.3. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	48
4.5.4. Penetapan Dosis	49
4.5.5. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	49
4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan	50
4.5.7. Analisis Ekspresi SMAD4 dan COL1 menggunakan Imunohistokimia (IHC) dan <i>Software ImageJ 1.54p</i>	51
4.6. Alur Penelitian	54
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian	55
4.8. Analisa Data	55
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	56
5.1. Hasil Penelitian.....	56
5.1.1. Evaluasi Makroskopis Kulit Punggung Tikus	56
5.1.2. Hasil analisis ekspresi COL1 jaringan kulit pada tiap kelompok	58
5.1.3. Hasil Analisis Ekspresi SMAD4 Jaringan Kulit pada Tiap Kelompok	61
5.2. Pembahasan	65
5.3. Keterbatasan Penelitian	69
BAB VI KESIMPULAN.....	72
6.1. Kesimpulan.....	72
6.2. Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN.....	83

DAFTAR SINGKATAN

AAGS	<i>Asiatic acid glucosamine salt</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CPD	<i>Cyclobutane-pyrimidine dimer</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	<i>The extracellular matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GPX	<i>Glutathione peroxidase</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMP-2	<i>Matrix Metalloproteinase-2</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
NF- κ b	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
UVB	<i>Ultraviolet B</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	4
Tabel 2.1. Profil Fitokimiawi ekstrak <i>Centella asiatica</i>	28
Tabel 4.1. Formula Krim Vehikulum	48
Tabel 5. 1. Hasil analisis statistik ekspresi COL1	58
Tabel 5. 2 Hasil analisis statistik ekspresi SMAD4	62



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Lapisan dari setiap kulit	10
Gambar 2.2.	Sumber UV meliputi UV buatan dan UV matahari. Penyerapan sinar UV matahari pada kulit	12
Gambar 2.3.	Gambaran skematis dari jalur pensinyalan TGF β yang bergantung pada SMAD2.....	17
Gambar 2.4.	Tanaman <i>Centella asiatica</i>	24
Gambar 2.5.	Rumus molekul beberapa senyawa utama <i>Centella asiatica</i>	25
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	39
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep.....	40
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian.....	41
Gambar 4.2.	(A) Gambar IHC Asli, dan (B) Hasil Thresholding Hitam-Putih. .	52
Gambar 4.3.	Alur Penelitian	54
Gambar 5.1.	Grafik rata-rata ekspresi COL1 setiap kelompok perlakuan.....	60
Gambar 5.2.	Gambaran Histopatologi Ekspresi COL1 pada Jaringan Kulit Tikus.....	61
Gambar 5.3.	Grafik rata-rata ekspresi SMAD4 setiap kelompok perlakuan	63
Gambar 5.4.	Gambaran Histopatologi Ekspresi SMAD4 pada Jaringan Kulit Tikus	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Izin Etik Penelitian	83
Lampiran 2.	Keterangan Hasil Penelitian dari Lab UNS	84
Lampiran 3.	Dokumentasi penelitian.....	86
Lampiran 4.	Dokumentasi Hasil Mikroskopis Imunohistokimia	90
Lampiran 5.	Statistik Ekspresi SMAD4	100



ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan sinar ultraviolet B (UVB) memicu stres oksidatif dan degradasi matriks ekstraseluler, yang menyebabkan penuaan dini (*photoaging*) yang ditandai dengan penurunan sintesis kolagen. *Centella asiatica*, (*C. asiatica*) yang dikenal karena sifat reparatif dan antioksidannya, dapat memodulasi pemulihan dermal melalui jalur TGF- β /SMAD.

Tujuan : Untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak *C. asiatica* terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe I (COL1) pada tikus Wistar yang dipapar UVB.

Metode : Penelitian eksperimental *in-vivo*, menggunakan rancangan penelitian *posttest only control group* dengan *completely randomized design*. Subjek penelitian adalah tikus jantan galur *wistar* sebanyak 25 ekor diacak dan dibagi menjadi 5 kelompok: K1 (tikus sehat), K2 (tikus dipapar UVB + vehikulum), K3 (tikus dipapar UVB + *niacinamide* 5%), K4 (tikus dipapar UVB + *C. asiatica* 5%), dan K5 (tikus dipapar UVB + *C. asiatica* 10%). Setelah induksi UVB, pemberian krim diberikan 2 kali sehari selama 14 hari. Analisis ekspresi SMAD4 dan ekspresi COL1 dilakukan dengan metode imunohistokimia. Uji statistik deskriptif diikuti dengan uji normalitas, homogenitas, dan uji beda *One-Way ANOVA/kruskal Wallis*.

Hasil : Pemberian krim ekstrak *C. asiatica* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik terhadap ekspresi SMAD4 ($p = 0,2121$). Pemberian krim ekstrak *C. asiatica* juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik terhadap ekspresi COL1 ($p = 0,1554$). Namun, tren deskriptif menunjukkan bahwa *C. asiatica* 5% meningkatkan ekspresi SMAD4, sementara *C. asiatica* 10% memulihkan ekspresi COL1 mendekati tingkat normal.

Kesimpulan : Pemberian krim ekstrak *C. asiatica* 5% dan 10% tidak berpengaruh terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi COL1 pada kerusakan kulit akibat paparan UVB.

Kata kunci: *Centella asiatica*; kolagen tipe I; SMAD4; UVB; *photoaging*

ABSTRACT

Background: Exposure to ultraviolet B (UVB) light triggers oxidative stress and extracellular matrix degradation, leading to premature aging (photoaging) characterized by decreased collagen synthesis. *Centella asiatica* (*C.asiatica*), known for its reparative and antioxidant properties, can modulate dermal repair through the TGF- β /SMAD pathway.

Objective: To determine the effect of *Centella asiatica* extract cream on SMAD4 and type I collagen (COL1) expression in Wistar rats exposed to UVB.

Methods: This was an in-vivo experimental study using a posttest-only control group design with a completely randomized design. The study subjects were 25 male Wistar rats, randomly divided into 5 groups: K1 (healthy rats), K2 (rats exposed to UVB + vehicle), K3 (rats exposed to UVB + 5% niacinamide), K4 (rats exposed to UVB + *C. asiatica* 5%), and K5 (rats exposed to UVB + *C. asiatica* 10%). After UVB induction, the cream was administered twice daily for 14 days. Analysis of SMAD4 and COL1 expression was performed using immunohistochemistry. Descriptive statistical tests were followed by normality, homogeneity, and *One-Way* ANOVA/Kruskal Wallis tests.

Results: The administration of *C. asiatica* extract cream did not show a statistically significant difference in SMAD4 expression ($p = 0.2121$). The application of *C. asiatica* extract cream also showed no statistically significant difference in COL1 expression ($p = 0.1554$). However, descriptive trends indicated that 5% *C. asiatica* increased SMAD4 expression, while 10% *C. asiatica* restored COL1 expression to near-normal levels.

Conclusion: The application of 5% and 10% *C. asiatica* extract creams had no effect on SMAD4 and COL1 expression in skin damage caused by UVB exposure.

Keywords: *Centella asiatica*; type I collagen; SMAD4; UVB; photoaging

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Paparan radiasi ultraviolet B (UVB) yang meningkat akibat penipisan lapisan ozon memicu stres oksidatif, inflamasi, dan degradasi kolagen tipe 1, yang dimediasi oleh *Matrix Metalloproteinase* (MMP) ^{1,2}. Meskipun *Centella asiatica* dikenal berpotensi memperbaiki kerusakan kulit, penelitian yang secara komprehensif mengkaji dampaknya terhadap ekspresi protein SMAD4 dan kolagen tipe 1 (COL1) sebagai respons terhadap paparan UVB pada tikus Wistar masih belum ada. Penelitian ini dirancang untuk mengisi kesenjangan tersebut, guna membangun landasan bagi strategi terapi yang lebih efektif dalam menangani kerusakan kulit akibat UVB.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah mengonfirmasi berbagai manfaat *Centella asiatica*, seperti peningkatan sintesis kolagen ³, pengurangan penanda inflamasi seperti IL-1 α dan TNF- α ^{4,7}, serta peningkatan ekspresi TGF- β 1 sebagai respons terhadap UVB ⁵. Namun, studi-studi tersebut umumnya berfokus pada penanda hulu (inflamasi atau stres oksidatif) atau pada salah satu aspek perbaikan kulit. Penelitian kami mengambil langkah lebih jauh dengan menganalisis mediator hilir yang krusial, yaitu SMAD4 dan Col1, untuk memberikan gambaran yang lebih

presisi mengenai mekanisme degradasi dan regenerasi matriks ekstraseluler (ECM) secara terintegrasi.

Keunggulan metodologis penelitian ini terletak pada penerapan model paparan UVB sub-akut selama 14 hari, yang lebih relevan untuk studi *photoaging* dibandingkan model 5 hari yang umum digunakan pada riset sebelumnya, sehingga memastikan kerusakan ECM yang lebih mapan sebelum intervensi. Selain itu, penggunaan *Niacinamide* 5% sebagai kontrol positif aktif memberikan perbandingan terapeutik yang lebih relevan dibandingkan studi yang menggunakan kontrol yang hanya bersifat protektif. Dengan demikian, penelitian ini menawarkan evaluasi yang lebih komprehensif mengenai mekanisme perbaikan ECM oleh *Centella asiatica* pada tingkat molekuler.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Apakah terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe 1 pada kerusakan kulit akibat paparan UVB

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*)

terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus wistar yang dipapar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5% dan 10% terhadap ekspresi SMAD4 pada tikus wistar yang dipapar UVB.

1.3.2.2. Untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5% dan 10% terhadap ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus wistar yang dipapar UVB.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Sebagai tambahan pengetahuan mengenai pengaruh pemberian krim ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus wistar yang dipapar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan referensi bagi peneliti lain maupun masyarakat luas dalam pengembangan strategi pencegahan dan pengobatan kerusakan kulit akibat sinar UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Yeny D. Rahmawati <i>et al.</i>	<i>Effects of Oral and Topical Application of Centella asiatica Extracts on UVB-Induced Photoaging of Hairless Rats</i>	Tikus tidak berbulu yang terpapar UVB (840 mJ/cm ² selama 4 minggu), diobati dengan oral (250 mg/kg BW) dan topikal (2,5%, 5%, 10%) <i>Centella asiatica</i> . Mengukur ekspresi TGF- β 1 dan tingkat MDA.	Ekspresi TGF- β 1 secara signifikan dipulihkan pada 5% dan 10% <i>Centella asiatica</i> ($p < 0,05$). Ekspresi MDA berkurang secara signifikan pada konsentrasi 10% ($p < 0,05$). Efeknya tergantung pada dosis
Sri Purmawanti <i>et al.</i>	<i>In vivo study of Centella asiatica leaf extract cream for Matrix Metalloproteinase-1 inhibition and collagen enhancement to prevent photoaging</i>	Mencit BALB/c yang terpapar UVB (360 mJ/cm ² , 5 hari), diobati dengan krim <i>Centella asiatica</i> 10% & 20% selama 14 hari. MMP-1 & kolagen diukur melalui pewarnaan IHC & Sirius Red.	<i>Centella asiatica</i> meningkatkan kepadatan kolagen ($p = 0,04$) tetapi tidak secara signifikan menghambat MMP-1 ($p = 0,053$).
Libia Sari	<i>Pengaruh Krim Ekstrak Centella asiatica (Centella asiatica) Terhadap Ekspresi Interleukin-1α dan Sunburn Sel</i>	Mencit BALB/c yang terpapar UVB (360 mJ/cm ² , 5 hari), diobati dengan krim <i>Centella asiatica</i> 10% & 20%. Mengukur ekspresi IL-1 α & sel sengatan matahari.	Ekspresi IL-1 α berkurang secara signifikan: 82,5 \pm 3,6 (kontrol negatif) \rightarrow 48,3 \pm 8,3 (10% <i>C. asiatica</i> , $p = 0,044$) \rightarrow 43,3 \pm 7,6 (20% <i>C. asiatica</i> , $p = 0,013$). Sel-sel sengatan matahari berkurang tetapi tidak berbeda secara signifikan antara kelompok 10% dan 20% ($p > 0,05$).
Ririn Rahmayati	<i>Pengaruh Krim Ekstrak Centella asiatica (Centella asiatica) Terhadap Ekspresi TGF-β dan TNF-α</i>	Mencit BALB/c yang terpapar UVB (360 mJ/cm ² , 5 hari), diobati dengan krim <i>Centella asiatica</i> 10% &	Ekspresi TGF- β menurun secara signifikan: 68,33 \pm 22,28 (kontrol negatif) \rightarrow 31,67 \pm 5,14 (10% <i>C. asiatica</i> , penurunan 53,65%) \rightarrow 15,83 \pm 3,69 (20% <i>C.</i>

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
		20%. TGF- β & TNF- α terukur	asiatica, penurunan 76,83%, $p = 0,004$. Ekspresi TNF- α berkurang: $65,00 \pm 12,25$ (kontrol negatif) \rightarrow $38,34 \pm 9,42$ (10%) \rightarrow $19,17 \pm 4,64$ (20%), $p = 0,000$.
Nikko Fernando Venesia <i>et al.</i>	<i>Effectiveness Test of Centella asiatica Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rats</i>	<i>Studi in vivo</i> pada tikus Wistar (tanpa paparan UVB) yang diobati dengan krim <i>Centella asiatica</i> 10%. Kolagen & tingkat hidrasi diukur.	Ekstrak 10% meningkatkan kolagen sebesar 77,89% dan hidrasi sebesar 81,58%. Konsentrasi yang lebih rendah juga meningkatkan kedua parameter tersebut.

Beberapa penelitian terdahulu telah mengeksplorasi efek paparan UVB pada kulit, tetapi dengan parameter yang berbeda secara signifikan. Libia Sari (2024) dan Ririn Rahmayati (2024) menggunakan paparan UVB dengan dosis 360 mJ/cm^2 selama 5 hari berturut-turut, yang lebih tinggi per sesi dibandingkan penelitian saya tetapi dengan durasi yang jauh lebih singkat ^{1,2}. Libia Sari mengevaluasi IL-1 α dan sunburn cells, sementara Ririn Rahmayati mengukur ekspresi TGF- β dan TNF- α , tanpa menganalisis biomarker ECM seperti Col1 atau SMAD4. Yeny D. Rahmawati (2019) memberikan paparan UVB total sebesar 840 mJ/cm^2 selama 4 minggu, tetapi hanya mengevaluasi TGF- β 1 dan kadar MDA sebagai indikator stres oksidatif, tanpa meneliti ekspresi protein ECM ³. Penelitian Purmawanti *et al.* (2024) menggunakan paparan UVB 360 mJ/cm^2 selama 5 hari, diikuti oleh aplikasi krim *Centella asiatica* 10% dan 20% selama 14 hari ⁴. Namun, durasi paparan UVB yang pendek dalam studi ini tidak cukup

merepresentasikan degradasi ECM sub-akut akibat *photoaging*. Venesia *et al.* tidak menggunakan UVB, sehingga tidak relevan dalam mengevaluasi efek *Centella asiatica* dalam kondisi stres akibat UVB ⁵. Keunikan penelitian saya terletak pada penggunaan model UVB yang lebih lama dan bertahap dengan dosis 40–80 mJ/cm², panjang gelombang 312 nm, selama 14 hari tanpa terapi, kemudian 14 hari terapi tanpa UVB, dengan evaluasi 24 jam setelah sesi terakhir. Hal ini memastikan bahwa degradasi ECM telah terjadi sebelum terapi diberikan, memungkinkan penilaian efek *Centella asiatica* dalam proses regenerasi kulit secara lebih akurat.

Beberapa penelitian telah menggunakan tikus sebagai model *in vivo* dalam studi regenerasi kulit. Yeny D. Rahmawati (2019) dan Venesia *et al.* menggunakan tikus Wistar, tetapi penelitian Yeny lebih fokus pada stres oksidatif melalui TGF- β 1 dan MDA, tanpa mengevaluasi regenerasi ECM. Libia Sari (2024) dan Ririn Rahmayati (2024) menggunakan mencit BALB/c, yang memiliki respons inflamasi dan penyembuhan luka yang berbeda dibandingkan Wistar. Penelitian Purmawanti *et al.* (2024) juga menggunakan mencit BALB/c, yang lebih sering digunakan dalam studi imunologi dibandingkan *photoaging*. Keunggulan penelitian saya adalah penggunaan tikus Wistar yang lebih cocok untuk model *photoaging*. Dengan paparan UVB selama 14 hari sebelum terapi, penelitian ini lebih merepresentasikan kerusakan ECM yang progresif, seperti yang terjadi pada kulit manusia akibat paparan sinar matahari jangka panjang.

Penelitian terdahulu umumnya lebih menekankan pada inflamasi atau sintesis kolagen, tanpa mengeksplorasi mekanisme molekuler yang mengatur regenerasi ECM. Libia Sari (2024) hanya meneliti IL-1 α dan sunburn cells, tanpa mengevaluasi jalur TGF- β /SMAD yang berperan dalam regenerasi kulit. Yeny D. Rahmawati (2019) mengukur TGF- β 1 dan kadar MDA, tetapi tidak menganalisis ekspresi SMAD4 atau Col1, sehingga tidak dapat menjelaskan regenerasi ECM secara langsung. Ririn Rahmayati (2024) mengevaluasi ekspresi TGF- β dan TNF- α , tetapi tidak meneliti ekspresi SMAD4 secara spesifik, yang merupakan faktor transkripsi utama dalam regulasi keseimbangan ECM. Penelitian Purmawanti *et al.* (2024) hanya mengukur MMP-1 dan kepadatan kolagen, tetapi tidak mengevaluasi jalur molekuler yang mengontrol degradasi atau regenerasi ECM. Venesia *et al.* hanya mengukur kadar kolagen, tanpa mengevaluasi mekanisme yang mengatur peningkatan atau penurunannya. Penelitian saya memiliki keunggulan dalam mengukur ekspresi SMAD4 sebagai regulator utama dalam sintesis Col1, menggunakan metode imunohistokimia (IHC) pada jaringan kulit tikus Wistar. Dengan demikian, penelitian ini tidak hanya mengevaluasi efek antiinflamasi atau peningkatan kolagen, tetapi juga menganalisis mekanisme molekuler yang mengontrol regenerasi ECM setelah paparan UVB.

Studi sebelumnya telah menggunakan krim *Centella asiatica*, tetapi dengan parameter yang berbeda. Libia Sari (2024) dan Ririn Rahmayati (2024) menggunakan krim *Centella asiatica* dengan konsentrasi 10% dan

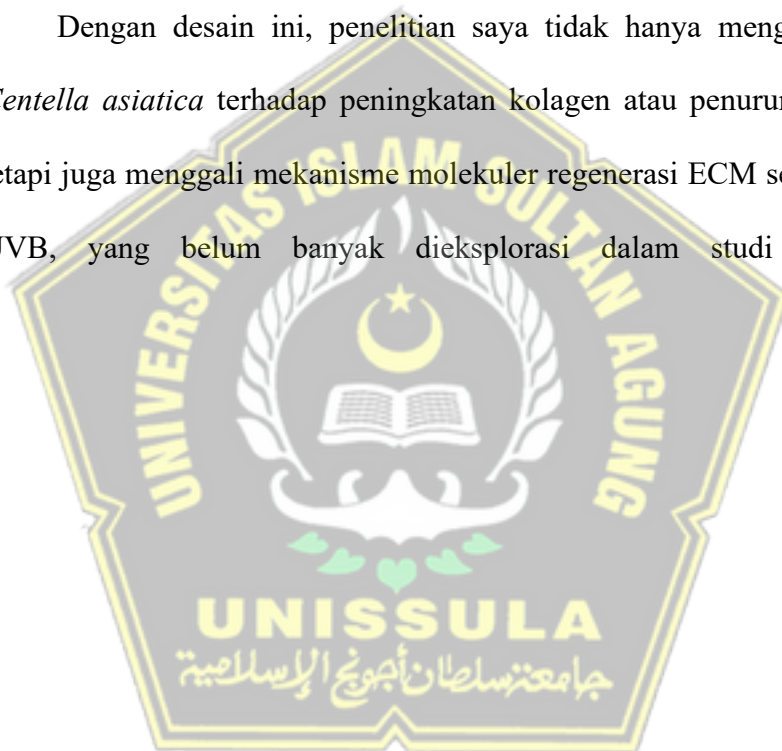
20%, tetapi hanya selama 5 hari, yang terlalu singkat untuk mengevaluasi regenerasi ECM secara menyeluruh. Yeny D. Rahmawati (2019) menggunakan terapi oral (250 mg/kgBB) dan topikal dalam variasi 2.5%, 5%, dan 10%, tetapi tidak memiliki kelompok kontrol positif selain Parasol sebagai pembanding efek fotoproteksi. Penelitian Purmawanti *et al.* (2024) menggunakan krim *Centella asiatica* 10% dan 20% selama 14 hari setelah UVB, tetapi tidak memiliki kelompok kontrol positif (senyawa pembanding). Venesia *et al.* hanya menggunakan *Centella asiatica* 10% tanpa UVB, sehingga sulit dibandingkan dengan penelitian berbasis *photoaging*. Penelitian saya memiliki keunggulan dalam menggunakan dua dosis krim *Centella asiatica* (5% dan 10%), yang diaplikasikan dua kali sehari selama 14 hari setelah paparan UVB. Selain itu, penelitian ini juga memiliki kelompok kontrol yang lebih lengkap, termasuk kontrol positif (*Niacinamide* 5%), kontrol negatif UVB, vehicle control, dan kelompok tikus sehat, sehingga hasil yang diperoleh lebih valid dan memastikan bahwa efek yang diamati benar-benar berasal dari *Centella asiatica* dan bukan dari faktor lain dalam formulasi krim.

Penelitian saya menawarkan pendekatan yang lebih komprehensif dibandingkan studi sebelumnya, dengan keunggulan sebagai berikut:

- Model *UVB-induced ECM degradation* yang lebih panjang (14 hari tanpa terapi sebelum intervensi), memastikan degradasi ECM telah terjadi sebelum terapi dimulai.

- Menggunakan tikus Wistar, yang lebih representatif untuk model *photoaging* dibandingkan Balb/c.
- Menganalisis ekspresi SMAD4 dan Col1 menggunakan metode IHC, bukan hanya inflamasi atau hidrasi kulit.
- Menggunakan kelompok kontrol yang lebih lengkap, termasuk *vehicle control* & *Niacinamide 5%* sebagai kontrol positif.

Dengan desain ini, penelitian saya tidak hanya mengevaluasi efek *Centella asiatica* terhadap peningkatan kolagen atau penurunan inflamasi, tetapi juga menggali mekanisme molekuler regenerasi ECM setelah paparan UVB, yang belum banyak dieksplorasi dalam studi sebelumnya.



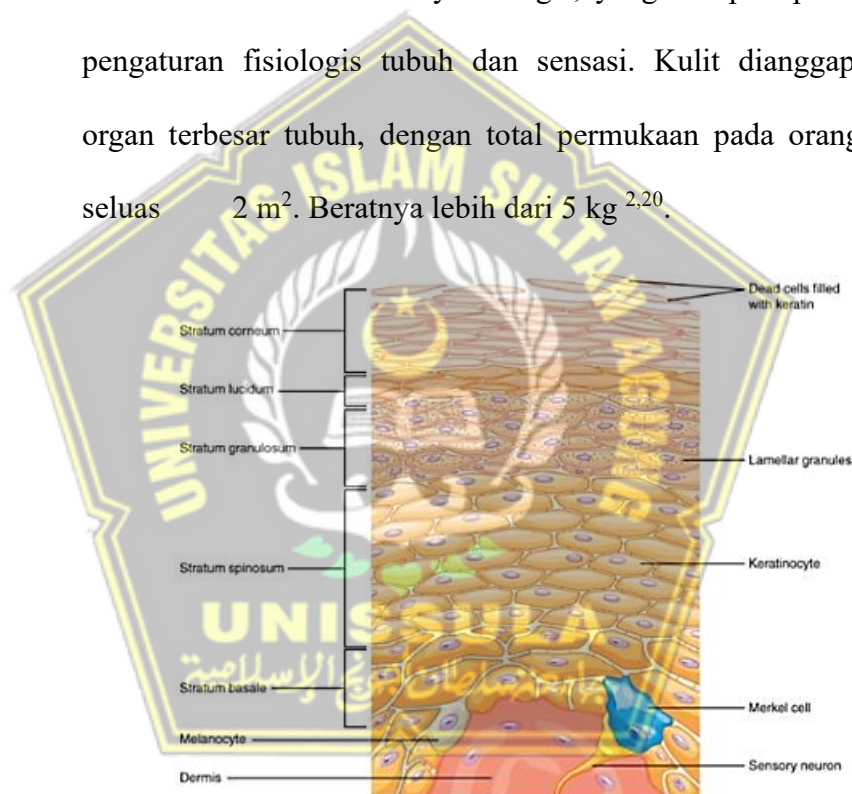
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Paparan UVB pada kulit

2.1.1. Anatomi Kulit

Kulit merupakan jaringan lunak dan dangkal yang menutupi tubuh. Kulit memiliki banyak fungsi, yang meliputi perlindungan, pengaturan fisiologis tubuh dan sensasi. Kulit dianggap sebagai organ terbesar tubuh, dengan total permukaan pada orang dewasa seluas 2 m^2 . Beratnya lebih dari 5 kg ^{2,20}.



Gambar 2.1. Lapisan dari setiap kulit¹⁸

Kulit manusia terdiri dari beberapa lapisan dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Lapisan tertinggi kulit disebut epidermis. Epidermis berfungsi sebagai pelindung fisik terhadap faktor-faktor eksternal seperti sinar UV, cuaca, dan infeksi. Ketebalan epidermis bervariasi tergantung pada bagian tubuhnya, dengan bagian yang

lebih tebal seperti telapak tangan dan telapak kaki. Epidermis terdiri dari beberapa lapisan, termasuk stratum korneum yang terdiri dari sel-sel keratin mati, stratum lucidum yang hanya ditemukan di area kulit yang tebal, stratum granulosum yang mengandung keratin dan lipid, stratum spinosum yang berperan menyatukan dan memberikan kekuatan pada sel-sel, serta stratum germinativum yang menghasilkan sel-sel baru²⁰.

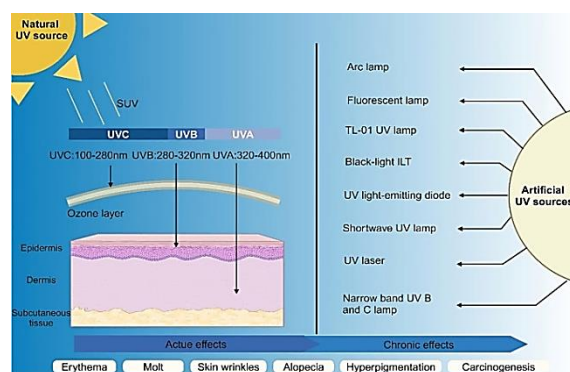
Di bawah epidermis terdapat lapisan kulit yang lebih tebal yang disebut dermis. Dermis terdiri dari dua lapisan, yaitu dermis papiler dan dermis retikuler. Dermis papiler mengandung jaringan ikat longgar dan pembuluh darah kecil, serta ujung saraf yang sensitif terhadap sentuhan. Dermis retikuler lebih tebal dan terdiri dari jaringan ikat yang lebih padat, kolagen, dan elastin, yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit. Dermis juga mengandung folikel rambut, kelenjar sebacea (minyak), dan kelenjar keringat. Di bawah dermis terdapat lapisan kulit yang terletak di atas jaringan otot, yaitu jaringan subkutan atau hipodermis. Jaringan ini mengandung jaringan lemak dan jaringan ikat, berfungsi sebagai penyimpan energi, memberikan bantalan dan perlindungan bagi organ-organ di bawahnya, serta membantu mengatur suhu tubuh²⁰.

2.1.2. Skin Damage (Kerusakan Kulit)

Kulit manusia merupakan organ terbesar dalam tubuh yang melindungi organ dari paparan lingkungan. Kerusakan kulit terjadi

karena faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik adalah proses fisiologis normal terjadi penuaan kulit sehingga menjadi kulit kering, tipis, keriput, gatal sehingga rentan terhadap infeksi dan kelainan kulit lainnya. Faktor eksternal seperti polutan, merokok, diet, suhu, dan radiasi *ultraviolet* (UV) juga mempengaruhi kerusakan kulit dengan memperburuk inflamasi dan menyebabkan keriput, pigmentasi yang tidak teratur, kulit kering, dan penurunan ketebalan kulit²².

Radiasi UV yang berlebihan secara akut dapat bermanifestasi menjadi eritema seperti kulit terbakar dan memicu stimulasi peningkatan produksi melanin. Paparan kronis terhadap sinar UV dapat menyebabkan perubahan degeneratif pada sel, jaringan fibrosa dan pembuluh darah sehingga terjadi perkembangan bintik coklat, nevi, lentigin, dan pigmentasi coklat yang menyebar pada kulit serta meningkatkan risiko kanker kulit seperti melanoma, karsinoma sel basal, dan karsinoma sel skuamosa. Semakin tinggi dosis radiasi UV, semakin tinggi risiko terkena kanker kulit²³.



Gambar 2.2. Sumber UV meliputi UV buatan dan UV matahari. Penyerapan sinar UV matahari pada kulit²⁰

Paparan sinar UV juga memicu aktivasi jalur TGF- β dalam sel kulit. Jalur ini berperan dalam perbaikan DNA dan mengatur peradangan. Setelah TGF- β diaktifkan, sinyal diteruskan melalui protein SMAD yang mengontrol ekspresi gen. Jalur SMAD membantu mengatur transkripsi gen yang penting dalam perbaikan sel dan regulasi pertumbuhan. Selain itu, jalur ini juga membantu menjaga keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis, sehingga sel-sel yang rusak dapat dihilangkan secara beraturan. Melalui mekanisme ini, kulit dapat melindungi tubuh dari kerusakan akibat sinar UV²⁴.

Respon paparan sinar UV terutama pada UVB dapat menyebabkan beberapa dampak negatif seperti sinar UVB meningkatkan produksi ROS yang dapat memicu terjadi stres oksidatif dan merusak lipid, DNA, dan protein dalam sel. Hal ini dapat menyebabkan kematian sel. UVB juga dapat menyebabkan kerusakan pada DNA dan memicu pembentukan dimer fotokimia seperti *cyclobutane-pyrimidine dimer* (CPD) dan produk fotokimia 6-4, yang dapat menyebabkan mutasi genetik dan berkontribusi pada perkembangan kanker kulit. Paparan UVB dapat mengaktifkan jalur sinyal yang meningkatkan produksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan peningkatan ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), yang mengakibatkan reaksi inflamasi pada kulit terbakar. Terakhir, UVB juga berkontribusi pada penuaan kulit dengan

merusak kolagen dan elastin di dermis, yang menyebabkan keriput, kehilangan elastisitas, dan hiperpigmentasi ²³.

Dampak yang ditimbulkan jangka panjang dari paparan UV pada kulit, seperti *photoaging*, *photoimmunosupresi*, dan *photocarcinogenesis*. Radiasi UVA secara khusus memengaruhi keratinosit epidermis dan fibroblas kulit, sedangkan radiasi UVB terutama memengaruhi epidermis tetapi juga menembus dermis sehingga memiliki dampak seperti kulit terbakar, fotodermatitis, hiperpigmentasi, dan perkembangan lesi prakanker hingga kanker. Kerusakan ini dimediasi oleh pembentukan ROS karena paparan sinar UV yang berlebihan, yang dapat merusak kolagen dan elastin, yang menyebabkan berkurangnya ekspresi serat kulit ^{3,25}.

2.2. Ekspresi dan Aktivitas Protein SMAD

2.2.1. TGF- β

TGF- β adalah protein homodimer yang terdiri dari tiga isoform utama (TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3) dengan strukturnya dibentuk oleh rantai polipeptida dimerik yang saling terkait memiliki jalur pensinyalan serupa dan efek seluler serupa. Aktivitas biologis TGF- β dimulai dengan pengikatan ligan pada reseptor TGF- β tipe I dan tipe II, membentuk kompleks aktif pada permukaan sel. Terdapat dua jalur pensinyalan TGF- β , yaitu jalur SMAD dan jalur non-SMAD. Jalur SMAD melibatkan protein kompleks SMAD, untuk mengatur ekspresi gen target yang mempengaruhi pertumbuhan sel,

diferensiasi, produksi matriks ekstraseluler, serta regulasi peradangan. Selain itu, TGF- β juga dapat mengaktifkan jalur *non-SMAD* seperti *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *Fosfatidilinositol 3-kinase* (PI3K) atau *Protein kinase B* (AKT), dan Rho GTPase, yang berperan dalam migrasi sel dan regulasi fungsi seluler lainnya²⁶.

2.2.2. Proses Biosintesis oleh *Extracellular Matrix Production* (Peran Kolagen tipe I)

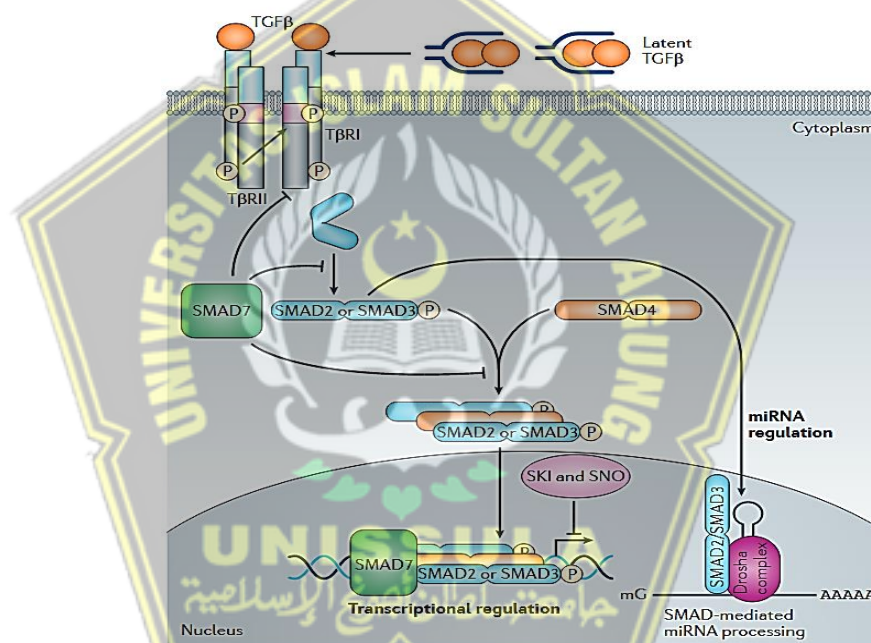
TGF- β adalah protein yang diproduksi di dalam sel dan memiliki peran penting dalam regulasi ekspresi gen terkait perbaikan jaringan, inflamasi, dan sintesis kolagen. TGF- β diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk fibroblas, sel endotel, sel imun, dan sel mesenkim. TGF- β disintesis sebagai prekursor polipeptida dalam retikulum endoplasma sel. Setelah itu, prekursor TGF- β menjadi kompleks laten yang terdiri dari TGF- β dan *latency-associated peptide* (LAP) yang berikatan dengan matriks ekstraseluler oleh *TGF- β binding proteins* (LTBPs)^{27,28}.

Pengaktifan TGF- β yang masih dalam kompleks laten dapat dengan beberapa mekanisme seperti melalui proteolisis oleh enzim *matrix metalloproteinases* (MMPs) sehingga dapat memecah pro-TGF- β kebentuk aktif yang diakibatkan oleh peradangan atau kerusakan sel. Selain itu, interaksi pro-TGF- β dengan LTBPs pada kondisi terdapat peningkatan tekanan mekanis atau perubahan pH

dapat juga mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan pelepasan TGF- β aktif. Selanjutnya dapat juga diaktivasi oleh sel imun, seperti makrofag dapat memproduksi enzim yang mengaktifkan pro-TGF- β , sehingga meningkatkan konsentrasi TGF- β aktif di lokasi cedera atau peradangan²⁷⁻²⁹.

Setelah diaktifkan, TGF- β dapat berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel target. Ketika TGF- β berikatan dengan TGF- β tipe II, reseptor ini mengaktifkan TGF- β tipe I melalui fosforilasi. Aktivasi ini memicu transduksi sinyal ke dalam sel melalui jalur SMAD. Di dalam nukleus, kompleks SMAD berfungsi sebagai faktor transkripsi yang dapat mengatur transkripsi gen target, misalnya gen yang mengkode kolagen tipe I. Setelah transkripsi gen kolagen tipe I, kolagen tipe I mengalami proses sintesis. Proses ini melibatkan beberapa tahap, mulai translasi yang membuat mRNA yang dihasilkan dari transkripsi gen kolagen tipe I diterjemahkan menjadi polipeptida kolagen di ribosom. Kolagen tipe I terdiri dari dua rantai alfa-1 (COL1A1) dan satu rantai alfa-2 (COL1A2). Setelah sintesis, rantai polipeptida kolagen mengalami modifikasi pasca-translasi, termasuk hidroksilasi residu prolin dan lisin, yang penting untuk stabilitas kolagen. Proses ini terjadi di retikulum endoplasma. Rantai polipeptida kolagen kemudian bergabung untuk membentuk struktur tripel heliks yang stabil. Setelah pembentukan tripel heliks, kolagen disekresikan ke dalam matriks ekstraseluler. Di

luar sel, kolagen tipe I akan mengalami pengikatan silang, yang meningkatkan stabilitas dan kekuatan kolagen. Pensinyalan TGF- β mengatur *the extracellular matrix* (ECM), yang mencakup protein seperti kolagen (Kolagen tipe I $\alpha 1$). ECM sangat penting untuk menjaga struktur dan integritas kulit. Peningkatan produksi ECM berkontribusi pada penyembuhan luka atau kerusakan jaringan, sedangkan produksi yang berlebihan dapat menyebabkan fibrosis ²⁹.



Gambar 2.3. Gambaran skematis dari jalur pensinyalan TGF β yang bergantung pada SMAD ⁶

2.2.3. Jalur Sinyal TGF- β

TGF- β adalah sitokin yang memiliki peran penting dalam regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi, dan respons imun. Dalam konteks kulit, TGF- β berkontribusi pada homeostasis jaringan dan perbaikan setelah cedera, serta berfungsi sebagai mediator dalam respons terhadap paparan UV. TGF- β dapat memicu jalur sinyal

yang melibatkan protein SMAD, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam perlindungan kulit. Jalur SMAD adalah jalur utama yang diaktifkan oleh TGF- β . Setelah TGF- β mengikat reseptornya, kompleks reseptor akan mengaktifkan protein SMAD2^{7,30,31}.

SMAD2 dan SMAD3 adalah protein yang diaktifkan setelah pengikatan TGF- β . Mereka membentuk kompleks dengan SMAD4 dan bergerak ke dalam inti sel. Kompleks ini berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam perbaikan jaringan, regulasi peradangan, dan produksi kolagen. Aktivasi SMAD2 dan 3 dapat meningkatkan ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis kolagen dan matriks ekstraseluler, yang penting untuk menjaga integritas kulit. SMAD4 diperlukan untuk transduksi sinyal dari SMAD2 dan SMAD3. Tanpa SMAD4, sinyal yang dihasilkan oleh TGF- β tidak bisa diteruskan ke inti sel. SMAD4 juga berperan dalam mengatur gen yang terlibat dalam respons terhadap stres oksidatif dari sinar UV. Sedangkan SMAD7 adalah protein penghambat yang mengatur pensinyalan TGF- β di jalur aktivasi SMAD2 dan 3 sehingga membantu mengontrol respon inflamasi serta mencegah fibrosis berlebihan akibat paparan sinar UV pada kulit²⁷.

Penurunan aktivitas SMAD dapat mengarah pada akumulasi penuaan sel dan peningkatan peradangan dalam jaringan. Hal ini

dikaitkan dengan peran dari SMAD7 yang menghambat pensinyalan TGF- β sebagai antagonis terhadap pensinyalan kompleks reseptor TGF- β dan mencegah fosforilasi SMAD2 dan SMAD3³². Penggunaan topikal protein SMAD7 rekombinan (Tat-SMAD7) pada model tikus transgenik menunjukkan percepatan penyembuhan luka dengan mengurangi peradangan dan respons fibrotik akibat peradangan kulit yang diinduksi TGF- β 1, fibrosis, dan hiperplasia epidermis^{32,33}. Disisi lain, overekspresi SMAD7 dapat mengurangi efek penghambatan MMP-1, sehingga berpotensi meningkatkan kerusakan jaringan dalam fibroblas yang melibatkan SMAD3 dan SMAD4 dalam mengatur degradasi matriks ekstraseluler. Oleh karena itu, keseimbangan antara SMAD3, SMAD4, dan SMAD7 sangat penting untuk menjaga integritas jaringan dan mencegah kerusakan yang disebabkan oleh respons inflamasi yang tidak terkontrol. Memahami ini dapat membantu dalam pengembangan strategi pencegahan yang lebih personal dan efektif dalam melindungi kulit dari kerusakan akibat radiasi UV^{36,37}.

2.2.4. Faktor yang Mempengaruhi Sinyal TGF- β jalur SMAD

Kadar TGF- β dalam konteks ini berkaitan dengan jumlah TGF- β aktif di lingkungan seluler, yang dapat mempengaruhi seberapa kuat dan efektif sinyal yang diteruskan melalui jalur SMAD. Beberapa faktor utama yang mempengaruhi kadar TGF- β pada jalur SMAD meliputi:

- Rangsangan inflamasi, cedera jaringan, atau stimulasi oleh molekul lain (misalnya sitokin) dapat meningkatkan sintesis TGF- β ^{11,27}.
- Perubahan lingkungan seperti pH dan radikal bebas dapat mempengaruhi kadar TGF- β aktif di mikrolingkungan selular sehingga aktivasi yang abnormal dapat menyebabkan ketidakseimbangan kadar TGF- β , yang terkait dengan berbagai kondisi patologis seperti kanker dan fibrosis ^{34,36}
- Kondisi peradangan kronis yang menyebabkan tumor hingga kanker akibat paparan UV yang berlebihan dapat memicu stres oksidatif dan hipoksia dapat meningkatkan produksi dan aktivasi TGF- β ¹⁰.
- Mutasi ekspresi reseptor TGF- β dapat mengurangi sensitivitas sel terhadap TGF- β , yang pada gilirannya mengurangi kadar sinyal aktif melalui jalur SMAD. Defek dari pensinyalan TGF- β , terutama pada sel epitel, fibroblas jaringan, dan sel kekebalan dapat mempengaruhi kekebalan sehingga resistensi penyakit-penyakit ini terhadap pengobatan. Misalnya kanker payudara, pensinyalan TGF- β 1 yang hiperaktif mendorong perkembangan kanker, disisi lain protein SMAD7 menjadi lemah untuk memberikan efek fenotip ke TGF- β 1 ^{33,34}.
- Inhibitor jalur SMAD termasuk protein SMAD7 yang berfungsi sebagai inhibitor endogen terhadap fosforilasi SMAD2 dan

SMAD3 dapat menurunkan kadar SMAD aktif di dalam sel sehingga mengurangi pengaruhnya pada regulasi ekspresi gen ²⁷.

2.2.5. Metode Pengukuran Sinyal TGF- β jalur SMAD

Aktivasi sinyal TGF- β terjadi melalui jalur SMAD, ketika TGF- β berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel, menginduksi fosforilasi SMAD dan transduksi sinyal ke inti sel. Beberapa Teknik yang dapat digunakan untuk memantau dan mengevaluasi aktivasi sinyal ³⁹.

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivasi sinyal SMAD adalah *Western blotting*. Metode yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur tingkat protein SMAD terfosforilasi. Prosedur ini melibatkan isolasi protein dari sel yang diobati dengan TGF- β , diikuti dengan pemisahan protein menggunakan elektroforesis gel *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Setelah dipindahkan ke membran, antibodi spesifik untuk SMAD digunakan untuk mendeteksi protein, dan intensitas pita yang muncul dianalisis untuk menentukan tingkat aktivasi ^{36,40,41}.

Metode lain yang efektif adalah *Immunofluorescence assays*. Teknik yang memungkinkan visualisasi lokasi dan distribusi SMAD dalam sel. Prosedur ini, sel diinduksi dengan mengaktifkan TGF- β , kemudian dilakukan fiksasi dan inkubasi dengan antibodi spesifik untuk SMAD. Setelah inkubasi dengan antibodi sekunder yang

terkonjugasi fluorofor, sel diamati menggunakan mikroskop fluorescence. Metode ini dapat menunjukkan sinyal TGF- β dalam distribusi seluler jalur SMAD4^{2,44}.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) juga digunakan untuk mengukur kadar TGF- β jalur SMAD yang terfosforilasi. Kadar TGF- β yang aktif dideteksi oleh ELISA pada homogenat jaringan, yang terlihat dari peningkatan TGF- β aktif. Metode menggunakan plate ELISA yang dilapisi dengan antibodi spesifik untuk SMAD. Sampel yang mengandung protein SMAD ditambahkan, dan setelah inkubasi dan deteksi dengan antibodi yang terkonjugasi enzim, kadar SMAD diukur berdasarkan aktivitas enzim. ELISA digunakan untuk melihat secara kuantitatif yang lebih cepat pada banyak sampel secara simultan⁴⁵.

Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) metode yang berguna untuk mengevaluasi ekspresi gen yang diinduksi oleh aktivasi SMAD. RT-qPCR dapat juga digunakan untuk mendeteksi distribusi dan ekspresi gen SMAD1, SMAD2 dan SMAD3 serta dapat mengamati ekspresi matriks metalloproteinase. PCR secara kuantitatif dilakukan untuk menentukan tingkat ekspresi gen target jalur SMAD sehingga dapat mengukur dampak fungsional dari aktivasi jalur SMAD pada ekspresi gen dan mekanisme molekuler di secara biologis TGF- β ^{32,34,35}.

Bioassay gene memungkinkan pengukuran aktivitas transkripsi yang diinduksi oleh TGF- β yang digunakan untuk identifikasi *bone morphogenetic protein* (BMP). Teknik melibatkan penyisipan gen reporter, seperti luciferase yang dapat diukur dengan luminometer. Sehingga aktivitas TGF- β diukur berdasarkan intensitas luminesensi atau fluoresensi yang dihasilkan oleh protein reporter di dalam sel ⁴⁸.

2.3. Ekstrak *Centella asiatica*

2.3.1. Definisi dari Tanaman *Centella asiatica*

Centella, juga dikenal sebagai pegagan atau gotu kola, rumput harimau, atau pennywort India, merupakan tanaman herba merambat yang berasal dari daerah rawa tropis di Asia Tenggara dan Australia. Tanaman ini telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional Ayurveda dan Cina karena khasiatnya yang beragam. Ekstrak *Centella* yang terdapat dalam tanaman ini mengandung lebih dari 100 konstituen, termasuk poliasetilena, flavonoid, flavon, sterol, dan lipid. Kandungan aktif utamanya adalah glikosida triterpenoid pentasiklik seperti asiaticoside, centelloside, madecassoside, dan asam asiatik serta asam madecassic. Kandungan triterpenoid memiliki sifat ansiolitik, antiinflamasi, antioksidan, antiulkus, antikanker, pelindung saraf, dan penyembuhan luka. *Centella asiatica* juga dapat dimakan sebagai sayuran atau salad ³¹.

2.3.2. Toksonomi dan Sitematika *Centella asiatica*

Klasifikasi toksonomi menurut *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (2019) ³²

Kingdom : *Plantae*

Phylum : *Tracheophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Order : *Apiales*

Family : *Apiaceae*

Species : *Centella asiatica* (L.) Urb.

Synonym(s) : *Centella uniflora* (Colenso) Nanf., *Hydrocotyle asiatica* L.

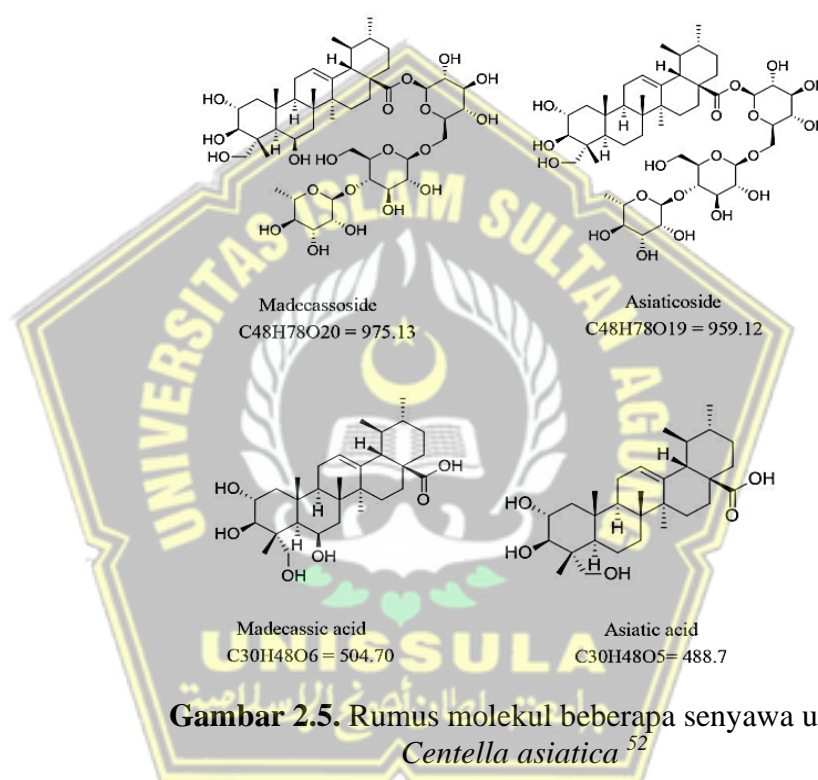


Gambar 2.4. Tanaman *Centella asiatica* ⁵⁰

Centella asiatica adalah tanaman merambat yang banyak tumbuh di daerah berawa di daerah tropis dan subtropis di dunia. Tanaman ini memiliki daun berbentuk sekop dengan tepi bergigi dan bunga yang tidak signifikan berwarna hijau atau putih kemerahan dan bijinya berbentuk labu dengan panjang 3-5 mm. Tanaman ini berasal dari Asia tropis seperti India, Asia Tenggara, Malaysia, Kepulauan Solomon, serta beberapa daerah beriklim sedang di Cina,

Jepang, Korea, dan Taiwan. Selain itu, tanaman ini juga ditemukan di negara-negara Afrika bagian selatan. Tanaman ini digunakan sebagai obat tradisional dan bahan makanan di banyak negara di Asia³³.

2.3.3. Ekstrak *Centella asiatica* (pegagan)



Ekstrak dari *Centella asiatica* atau pegagan mengandung senyawa bioaktif triterpenoid seperti asiaticoside, madecassoside, dan asiatic acid, yang efek terapeutik. Salah satu mekanisme kerja utama ekstrak *Centella asiatica* adalah efek anti-inflamasi, di mana senyawa dalam ekstrak dapat menghambat produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Selain itu, meningkatkan efek antioksidan dengan *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione*

peroksidase (GPx), yang membantu melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif. Ekstrak *Centella asiatica* juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan fungsi mitokondria, yang mendukung proses penyembuhan luka dan perbaikan sel ³⁴.

Peran *Centella asiatica* secara farmakologis terlibat dalam proses penyembuhan dan perbaikan kulit melalui berbagai mekanisme molekuler yang melibatkan interaksi kompleks antara senyawa bioaktif dan jalur signaling seluler. Salah satu jalur utama adalah *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), yang berperan dalam mengatur respons inflamasi, *adaptive immunity*, diferensiasi sel dan proliferasi sel. Ketika kulit mengalami kerusakan atau peradangan, sel-sel kulit melepaskan sitokin pro-inflamasi yang mengaktifkan NF- κ B, yang kemudian memicu ekspresi gen yang terlibat dalam peradangan. Senyawa dari *Centella asiatica*, terutama *madecassoside* dapat menghambat translokasi NF- κ B ke dalam inti sel, sehingga mengurangi produksi sitokin seperti IL-1 β dan TNF- α , yang berperan dalam peradangan

³⁵.

Selain itu, jalur TGF- β /SMAD juga berperan dalam proses penyembuhan luka. TGF- β adalah mediator dalam fibrosis jaringan, yang memicu aktivasi jalur SMAD. *Centella asiatica*, melalui senyawa aktifnya seperti *asiaticoside* dan *madecassoside*, dapat meningkatkan sintesis kolagen dan matriks ekstraseluler merangsang

fibroblas untuk memproduksi kolagen dan elastin, sehingga mempercepat proses penyembuhan luka. Jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) dan *Wnt/ β -catenin* juga terlibat dalam regulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel, untuk mendukung perbaikan jaringan dan mengurangi kerusakan. Aktivasi proses seluler yang terjadi seperti, proliferasi, diferensiasi, dan respons terhadap stress oksidatif dapat membentuk proliferasi *keratinocytes* yang meningkat mendukung reepitelialisasi. Selain itu, *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) signaling berperan dalam mengatur respons sel terhadap sitokin dan faktor pertumbuhan, yang juga berkontribusi pada proses penyembuhan dan perbaikan kulit³⁵.

Senyawa asiaticoside dan madecassoside yang berasal dari *Centella asiatica* berperan dalam penyembuhan luka melalui aktivasi *Focal Adhesion Kinase* (FAK), yang bertanggung jawab dalam mengatur migrasi sel dengan memfasilitasi interaksi sel dengan ECM sehingga memicu serangkaian reaksi pensinyalan yang mendukung migrasi dan proliferasi sel, terutama keratinosit yang berperan penting dalam penutupan luka. Selain itu, peran dari Akt, yang berperan sebagai mediator dalam jalur pensinyalan yang diinduksi oleh FAK. Aktivasi FAK memicu aktivasi Akt, yang kemudian mendorong migrasi dan proliferasi sel fibroblas dan keratinosit. Akt juga berperan dalam sintesis kolagen⁵⁴,

Sifat antioksidan dari *Centella asiatica* memiliki peran dalam paparan sinar ultraviolet (UV) yang dapat menyebabkan stres oksidatif, sehingga terjadi peningkatan produksi radikal bebas. Senyawa dalam *Centella asiatica*, seperti madecassoside, memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas, sehingga melindungi sel-sel kulit dari kerusakan ^{34,35}.

Tabel 2.1. Profil Fitokimiawi ekstrak *Centella asiatica* ⁶⁻⁸

Konstituen	Jumlah (mg/g)	Persentase (%)
Triterpenoid		
Madecassoside(MS)	30,23	45,13961
Asiaticoside (AS)	20,40	30,4614
Madecassic acid (MA)	2,03	3,031208
Asiatic acid (AA)	1,87	2,792295
Senyawa Fenolik		
5-CQA	1,81	2,702703
4-CQA	1,28	1,911304
3-CQA	2,74	4,091384
1,3-DiCQA	0,55	0,821263
3,4-DiCQA	0,83	1,239361
3,5-DiCQA	0,87	1,299089
1,5-DiCQA	0,94	1,403614
4,5-DiCQA	0,97	1,44841
Flavonoid		
Quercetin	0,48	0,716739
Kaempferol	0,35	0,522622
Rutin	0,29	0,43303
Minyak esensial		
β -pinene	0,32	0,477826
γ -terpinene	0,08	0,119456
Poliasetilen		
Cadynene	0,11	0,164253
Centalin	0,09	0,134389
Senyawa lain		
Brahmic acid	0,25	0,373301
Brahmoside	0,18	0,268777
Brahminoside	0,16	0,238913
Centelloside	0,14	0,209049

2.3.4. Proses Ekstrak Daun *Centella asiatica* menjadi krim 5% dan 10 %

- Langkah pertama adalah pengumpulan daun *Centella asiatica* segar, yang harus dipastikan bebas dari kontaminasi dan dalam kondisi baik. Setelah pengumpulan, dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran dan polutan pada daun. Proses selanjutnya daun dipotong kecil-kecil dan dikeringkan, yang dapat dilakukan di bawah sinar matahari atau menggunakan oven bersuhu rendah ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) untuk mencegah degradasi senyawa bioaktif⁵⁴.
- Langkah berikutnya adalah ekstraksi menggunakan pelarut etanol, dengan cara merendam daun dalam pelarut selama 24-72 jam dalam wadah tertutup dengan pengadukan yang teratur untuk memastikan senyawa terlarut dengan baik^{54,55}. Setelah proses ekstraksi, larutan yang dihasilkan disaring untuk memisahkan bahan padat dari ekstrak cair. Ekstrak cair kemudian dapat dipekatkan menggunakan rotary evaporator, menghilangkan pelarut sampai diperoleh ekstrak yang lebih kental⁵⁴.
- Proses formulasi krim, krim vehikulum yang terdiri dari fase minyak dan fase air disiapkan dengan pengemulsi untuk menciptakan emulsi stabil. Untuk krim 5%, 5-gram ekstrak *Centella asiatica* dicampur dengan 100 gram krim vehikulum, sedangkan untuk krim 10%, 10 gram ekstrak digunakan, lalu

diaduk hingga homogen ⁵⁶. Proses pencampuran dilakukan hingga homogen dan pH-nya disesuaikan kisaran pH 5 hingga 7 ^{55,57,58}.

- Terakhir, evaluasi stabilitas fisik serta kimia produk diuji untuk memastikan senyawa bioaktif tetap stabil selama penyimpanan untuk memastikan kualitas keseluruhan ^{57,59}.
- Simpan krim di tempat yang sejuk dan kering untuk mempertahankan efektivitas dan umur simpan produk. Pastikan juga untuk menjaga krim dari paparan sinar matahari langsung ⁵⁵.

2.3.5. Toksisitas Ekstrak Daun *Centella asiatica*

Centella asiatica dapat menyebabkan efek samping sesuai melalui oral dari dosis yang dianjurkan seperti reaksi alergi, rasa terbakar, dispepsia, mual, sakit kepala, dan peningkatan kadar glukosa dalam darah. Risiko hepatotoksisitas juga dapat terjadi. Pengobatan lebih dari 6 minggu tidak dianjurkan dan interaksi dengan obat lain tidak diketahui. Penggunaan oleh wanita menyusui tidak dianjurkan ³⁷.

Penelitian yang telah dilakukan pada penggunaan *Centella asiatica* secara oral menunjukkan bahwa dosis toksisitas dari ekstrak memberikan dosis INDCA hingga 2000 mg/kg kepada hewan percobaan dan mengamati mereka selama 14 hari pasca-perawatan. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada kematian dan tidak ada tanda klinis toksisitas yang terjadi selama periode evaluasi. Dosis letal 50 (LD50) lebih besar dari 2000 mg/kg, yang menunjukkan

tingkat toksisitas akut yang rendah. dosis INDCA secara oral pada dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg/hari selama 90 hari. Parameter yang dievaluasi meliputi berat badan, konsumsi makanan, serta analisis hematologi dan biokimia. Hasil menunjukkan bahwa tidak ada perubahan signifikan dalam berat badan atau konsumsi makanan di semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut aman untuk digunakan dalam dosis yang diteliti ³⁸.

Penelitian yang telah dilakukan Umam, (2020) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Centella asiatica* pada uji toksisitas akut diperoleh nilai LD50 lebih dari 5000 mg/kgbb. Pada kesimpulan yang didapatkan bahwa pemberian ekstrak *Centella asiatica* uji toksisitas akut dan sub kronis tidak menimbulkan toksik.

Meskipun beberapa penelitian menunjukkan keamanan dari ekstrak *Centella asiatica*, penggunaan ekstrak ini dalam bentuk salep di aplikasikan topikal memerlukan evaluasi toksisitas dan efikasi yang terpisahkan. Mengingat toksisitas yang rendah dari ekstrak daun pegangan diberikan secara oral maka penggunaan dalam bentuk salep juga aman.

2.3.6. Pengaruh Ekstrak *Centella asiatica* terhadap Protein SMAD pada Kerusakan Kulit

TGF- β berperan ketika terjadi kerusakan pada kulit, sehingga memicu jalur sinyal SMAD, yang berguna untuk mengatur ekspresi

gen dalam produksi kolagen dan komponen ECM lainnya. Namun, aktivasi berlebihan dari jalur ini dapat menyebabkan pembentukan jaringan parut yang berlebihan, ditandai dengan akumulasi kolagen yang berlebihan dan proliferasi fibroblas yang tidak terkontrol. Ekstrak *Centella asiatica* memiliki peran dalam menyeimbangkan dengan menghambat aktivasi berlebihan dari protein SMAD. Senyawa dalam ekstrak *Centella asiatica* seperti asiaticoside dan madecassoside dapat menurunkan ekspresi TGF- β dan mengurangi aktivasi jalur SMAD, sehingga mengurangi produksi kolagen yang berlebihan dan memperbaiki proses penyembuhan luka. Selain itu, terdapat peningkatan migrasi sel-sel keratinocyte, yang merupakan sel-sel utama dalam epidermis, melalui aktivasi jalur sinyal FAK, Akt, dan MAPK sehingga mempercepat proses penyembuhan luka dengan meningkatkan proliferasi dan migrasi sel-sel yang terlibat dalam regenerasi kulit. Senyawa *Centella asiatica* juga dapat merangsang sintesis komponen ECM, dengan peningkatan kolagen dan glikosaminoglikan, yang digunakan untuk menjaga integritas dan elastisitas kulit. Peningkatan komposisi ECM, dapat menciptakan lingkungan yang mendukung penyembuhan dan regenerasi yang lebih baik ^{7,34,35}.

2.4. Tikus *Wistar* sebagai Hewan Uji

2.4.1. Karakteristik Tikus *Wistar* sebagai Hewan Uji

Kriteria Tikus *Wistar* yang dapat digunakan sebagai hewan coba meliputi beberapa aspek :

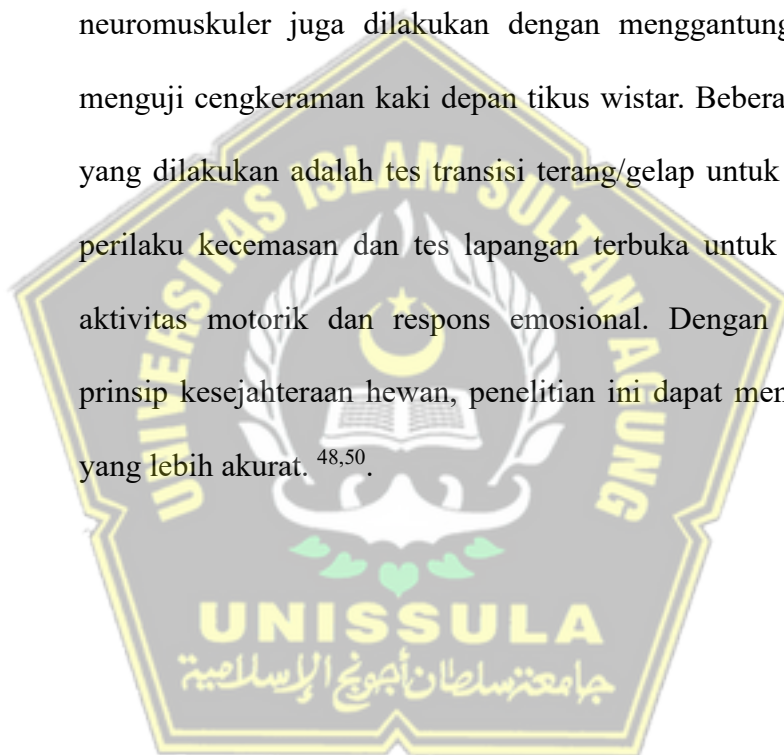
- Penting untuk mendapatkan hewan yang sehat dari pemasok resmi dan bersertifikat. Pengangkutan hewan coba, daya tahan, cuaca, dan jaraknya disesuaikan.
- Penyesuaian dalam adaptasi hewan coba pada aspek psikologis, serta waktu dan makanan yang diberikan kepada hewan. Kesejahteraan hewan coba sebagai pedoman untuk mengikuti prinsip 3R (*replacement, reduction, refinement*) dan prinsip 5F (*freedom*). Dalam 5 prinsip *freedom* dalam kesejahteraan hewan, yaitu kebebasan dari rasa lapar dan haus, ketidaknyamanan, rasa sakit, cedera, penyakit, takut, dan tertekan. Kebebasan dari rasa lapar dan haus dapat dicapai dengan memberikan pakan dan air secara *ad libitum* dan jenis pakan yang sesuai dengan nutrisi yang seimbang. Kebebasan dari ketidaknyamanan dapat dicapai dengan memperhatikan kebutuhan kandang yang sesuai dan faktor lingkungan seperti suhu dan pencahayaan. Kebebasan dari rasa sakit, cedera, dan penyakit dapat dicapai dengan tindakan preventif, diagnosis yang tepat, dan pengobatan yang benar. Kebebasan dari rasa takut dapat dicapai dengan menghindari prosedur dan teknik yang menyebabkan ketakutan pada hewan

dan memberikan masa transisi serta adaptasi sebelum penelitian. Ekspresi perilaku alami dapat dicapai dengan menyediakan ruang kandang yang cukup, kualitas kandang yang baik, persahabatan dengan sesama hewan, dan program pengayaan seperti mainan atau alat yang memungkinkan hewan mengekspresikan perilakunya.

- Kebersihan ruangan tempat hewan coba ditempatkan untuk menghindari kontaminasi. Pembersihan kandang, tempat makan dan minum secara teratur diperlukan dan penggunaan pengharum ruangan berbahan kimia dihindari. Praktik sanitasi yang tepat harus diterapkan untuk menjaga lingkungan yang bersih dan sesuai untuk satwa.
- Kandang harus diletakkan di dalam ruangan untuk menghindari stres suara. Ruangan tersebut harus memiliki ventilasi yang cukup untuk memberikan kualitas udara dan pasokan oksigen yang memadai. Suhu normal suatu lingkungan untuk tikus wistar berkisar 18-26°C.
- Umur dan berat tikus *wistar* yang digunakan bisa bervariasi tergantung penelitian, biasanya berkisar antara 7 minggu hingga 8 minggu dan berat badan antara 100 – 227 gr.am

Penerapan prinsip kesejahteraan hewan dalam penelitian membantu mengurangi stres pada hewan percobaan seperti tikus wistar. Tikus wistar sering digunakan dalam berbagai tes perilaku

seperti aktivitas motorik, refleks sensorik, kemampuan motorik, kecemasan, perilaku sosial, serta pembelajaran dan memori. Beberapa tes yang digunakan antara lain Barnes Maze, suspensi ekor, dan tes pengkondisian rasa takut. Selain itu, karakteristik fisik seperti suhu tubuh, berat badan, refleks neurologis, dan respons terhadap gerakan dinilai sebagai bagian dari penelitian ini. Tes neuromuskuler juga dilakukan dengan menggantung kawat serta menguji cengkeraman kaki depan tikus wistar. Beberapa tes lainnya yang dilakukan adalah tes transisi terang/gelap untuk mengevaluasi perilaku kecemasan dan tes lapangan terbuka untuk mengevaluasi aktivitas motorik dan respons emosional. Dengan menggunakan prinsip kesejahteraan hewan, penelitian ini dapat memberikan hasil yang lebih akurat.^{48,50}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) dengan panjang gelombang sekitar 312 nm pada dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan DNA (*DNA damage*) yang memicu respon inflamasi dan mengaktifkan jalur PI3K/AKT/mTOR, yang berperan dalam regulasi proliferasi, apoptosis, serta autofagi sebagai mekanisme pertahanan sel terhadap stres oksidatif. Paparan sinar UV secara akut dapat menimbulkan eritema, sedangkan paparan kronis menyebabkan perubahan degeneratif pada sel, jaringan fibrosa, dan pembuluh darah yang meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga memicu stres oksidatif pada jaringan kulit^{19,20,22,23}.

Akumulasi ROS akibat paparan UVB menstimulasi aktivasi jalur pensinyalan MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) yang menginduksi faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1. Kedua faktor ini berperan dalam peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi dan *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) yang menyebabkan degradasi kolagen serta penurunan integritas matriks ekstraseluler. Proses ini mempercepat terjadinya *photoaging*, ditandai dengan penurunan elastisitas kulit dan kerusakan struktur jaringan ikat^{19,20,22,23}.

Selain menyebabkan degradasi kolagen, stres oksidatif juga berpengaruh terhadap jalur pensinyalan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), yang berperan penting dalam regenerasi jaringan dan regulasi

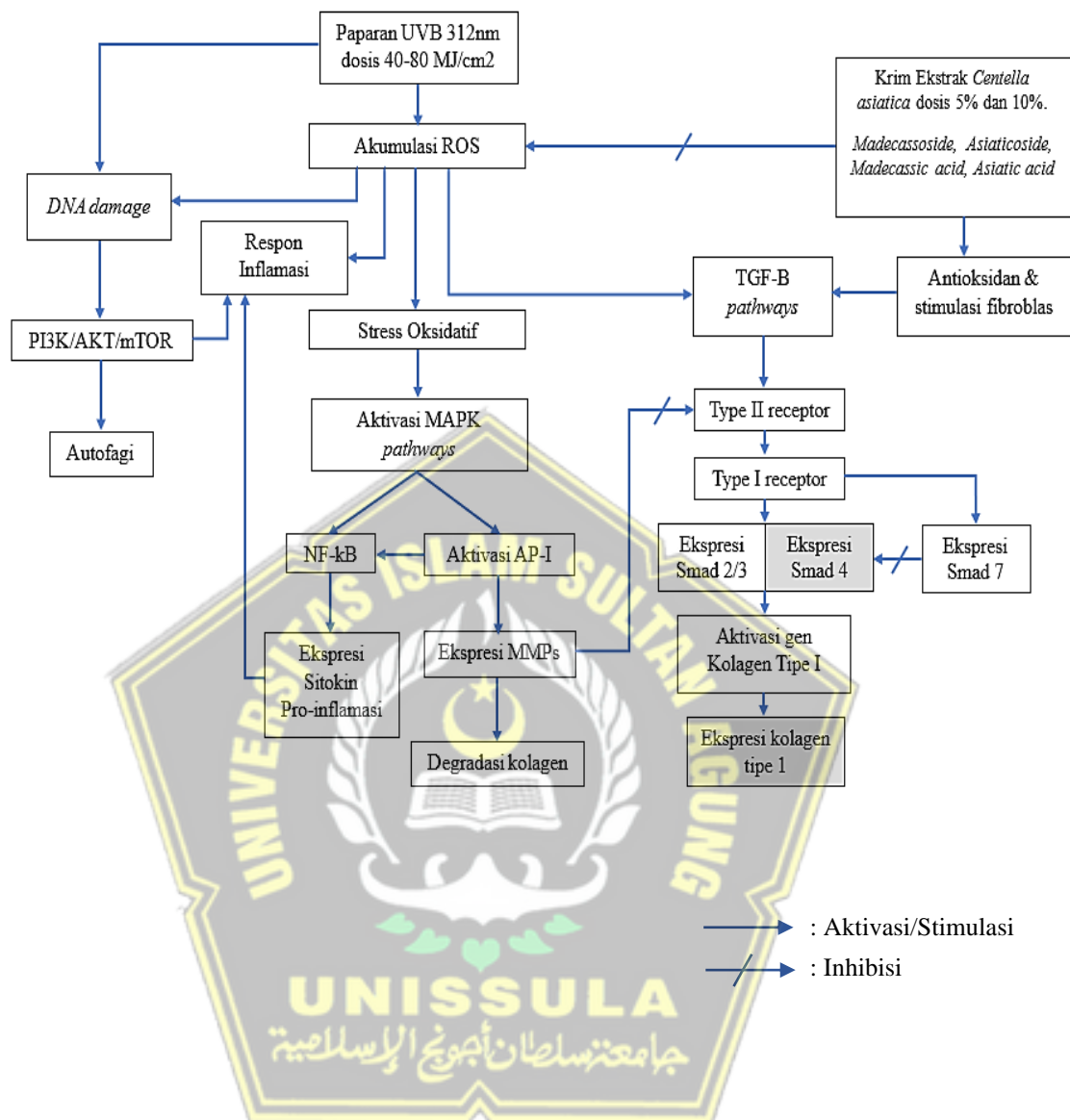
homeostasis kulit. TGF- β disintesis sebagai prekursor polipeptida di retikulum endoplasma dan mengalami pembentukan kompleks laten (*latent complex*) yang terdiri dari TGF- β dan *Latency-Associated Peptide* (LAP), kemudian berikatan dengan *Latent TGF- β Binding Proteins* (LTBPs) pada matriks ekstraseluler²⁴⁻²⁶.

Paparan UVB dapat menyebabkan peradangan dan kerusakan sel, yang kemudian memicu aktivasi TGF- β melalui proteolisis oleh enzim MMPs. Setelah diaktifkan, TGF- β berikatan dengan reseptor tipe II, yang kemudian merekrut dan memfosforilasi reseptor tipe I, sehingga menginisiasi aktivasi protein SMAD. SMAD2 dan SMAD3 yang terfosforilasi akan membentuk kompleks dengan SMAD4, berpindah ke inti sel, dan berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen kolagen tipe I (COL1A1) serta gen lain yang berperan dalam perbaikan jaringan dan regulasi inflamasi^{25-27,34,35}. Sebaliknya, SMAD7 bertindak sebagai regulator negatif yang menghambat fosforilasi SMAD2/3, sehingga mencegah aktivasi berlebihan dari TGF- β dan mengontrol risiko fibrosis akibat akumulasi kolagen berlebih^{25-27,34}. Jalur TGF- β /SMAD ini memiliki keseimbangan dinamis antara aktivasi perbaikan jaringan dan penghambatan fibrosis, yang sangat bergantung pada regulasi SMAD7^{25-27,34}.

Dalam konteks kerusakan kulit akibat UVB, peningkatan ROS juga mengaktifkan NF- κ B dan AP-1 yang memperburuk proses inflamasi, sementara menekan ekspresi kolagen melalui degradasi oleh MMPs. Namun, ekstrak *Centella asiatica* memiliki peran protektif terhadap

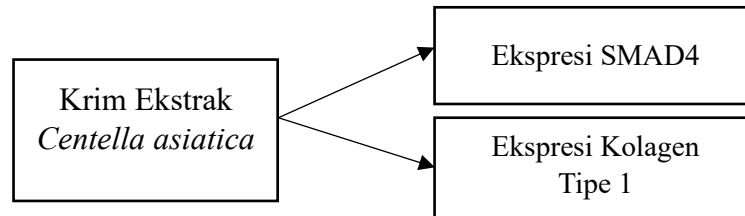
kerusakan kulit dengan dua mekanisme utama. Pertama, senyawa aktifnya seperti madecassoside, asiaticoside, *madecassic acid*, dan *asiatic acid* memiliki aktivitas antioksidan yang mampu menetralkan ROS dan menurunkan stres oksidatif, sehingga menekan aktivasi NF- κ B dan AP-1^{19,20,34,35}. Kedua, *Centella asiatica* juga memiliki efek stimulasi fibroblas yang meningkatkan aktivitas jalur TGF- β /SMAD2/3/4, menekan ekspresi SMAD7, serta meningkatkan transkripsi gen kolagen tipe I, sehingga memperkuat pembentukan matriks ekstraseluler dan mempercepat proses regenerasi jaringan kulit yang rusak akibat paparan UVB^{25-27,34,35}.

Secara keseluruhan, hubungan antara akumulasi ROS, aktivasi jalur MAPK dan NF- κ B, serta regulasi TGF- β /SMAD menggambarkan mekanisme molekuler yang kompleks antara kerusakan oksidatif, inflamasi, dan perbaikan jaringan kulit. Efek modulasi dari *Centella asiatica* terhadap jalur ini memberikan dasar ilmiah yang kuat bagi penggunaannya sebagai agen topikal anti-*photoaging* dan stimulator regenerasi dermal^{19-27,34,35}.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe I pada kulit tikus wistar yang mengalami kerusakan kulit akibat paparan UVB.

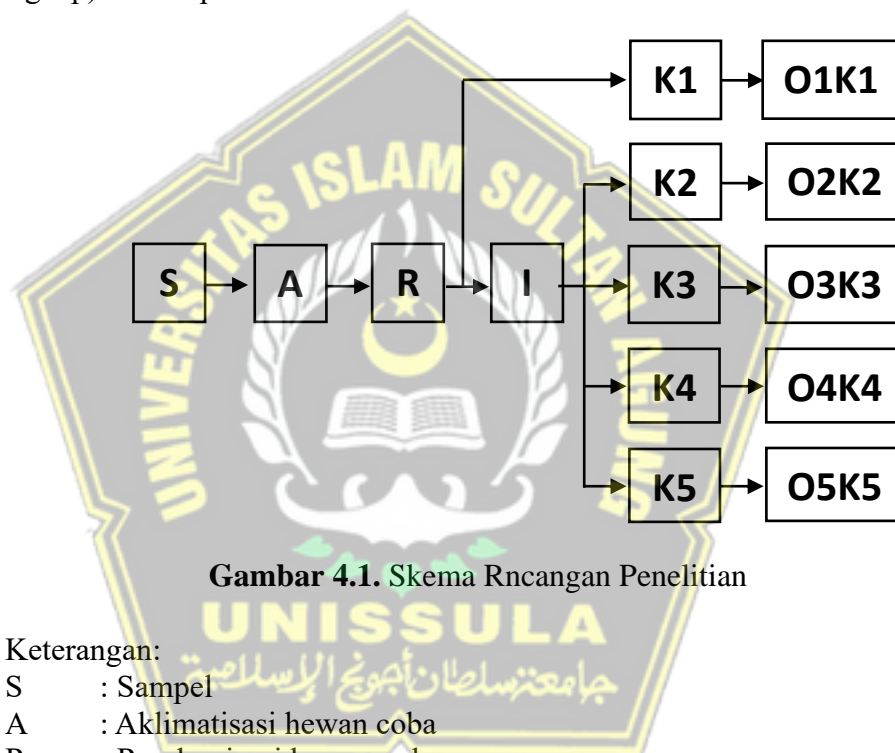


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* dengan *completely randomized design* (acak lengkap) terhadap hewan coba tikus.



Gambar 4.1. Skema Rncangan Penelitian

Keterangan:

- S : Sampel
- A : Aklimatisasi hewan coba
- R : Randomisasi hewan coba
- I : Induksi UVB
- K1 : Tikus sehat tidak diberi perlakuan
- K2 : Tikus dipapar UVB diberi *vehicle cream* / *placebo*
- K3 : Tikus dipapar UVB diberi krim *Niacinamide* 5%
- K4 : Tikus dipapar UVB diberi krim ekstrak daun pegagan dosis 5%
- K5 : Tikus dipapar UVB diberi krim ekstrak daun pegagan dosis 10%
- O1K1 : Observasi ekspresi protein SMAD4 dan Col1 kelompok K1
- O2K2 : Observasi ekspresi protein SMAD4 dan Col1 kelompok K2
- O3K3 : Observasi ekspresi protein SMAD4 dan Col1 kelompok K3
- O4K4 : Observasi ekspresi protein SMAD4 dan Col1 kelompok K4
- O5K5 : Observasi ekspresi protein SMAD4 dan Col1 kelompok K5

Hewan uji akan dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan berdasarkan agen topikal yang diberikan. *Niacinamide 5%* digunakan sebagai kontrol positif, mengingat efektivitasnya yang telah terbukti dalam meningkatkan kadar kolagen dan menghambat inflamasi akibat paparan UVB sehingga memiliki mekanisme kerja yang relevan dengan parameter penelitian. Perbandingan antara kelompok yang menerima *Centella asiatica* dengan kelompok *niacinamide* akan membantu menilai efektivitas relatif ekstrak herbal ini terhadap kontrol yang telah terbukti secara klinis.

4.2. Populasi Penelitian dan Sampel Penelitian

Populasi hewan uji pada penelitian adalah tikus jenis *Wistar* jantan (*Rattus norvegicus*) berusia antara 8 hingga 10 minggu, menunjukkan kisaran berat badan 150 hingga 200-gram, yang diperoleh dari Gedung *Integrated Biomedical Laboratories (IBL)* Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung di Semarang. Tikus *Wistar* dinilai oleh dokter hewan dan dianggap sehat dan cocok untuk digunakan dalam upaya penelitian.

Subjek percobaan terdiri dari tikus *Wistar* yang mengalami radiasi peak UVB 312 nm pada jarak 27 cm, menerima 2 Dosis Eritem Minimum (MED) 40-80 MJ/cm², diberikan 4 kali seminggu selama 14 hari, kemudian setelahnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

4.2.1. Teknik Pengambilan Sampel

Untuk menghitung ukuran sampel ideal, kita bisa menggunakan rumus Federer untuk penelitian eksperimental :

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

Dimana:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel per kelompok

Dalam kasus ini, t = 5 (5 kelompok perlakuan), jadi:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$N \geq 5$$

Jadi, minimal 5 sampel per kelompok sudah cukup.

4.2.2. Kriteria Sampel

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

- Tikus putih jantan galur wistar sehat
- Tikus memiliki berat antara 150-200 gram dan berusia 8-10 minggu.

4.2.2.2. Kriteria Eksklusi

- Tikus pernah digunakan untuk penelitian lain

4.2.2.3. Kriteria *Drop Out*

- Tikus *Wistar* mati saat penelitian berlangsung
- Tikus *Wistar* menjadi sakit akibat infeksi selama perlakuan

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel penelitian

4.3.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak *Centella asiatica* topikal dengan dosis 5%
2. Pemberian ekstrak *Centella asiatica* topikal dengan dosis 10%

4.3.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe I.

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Krim Ekstrak *Centella asiatica*

Centella asiatica diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Setelah diperoleh ekstrak

kental dibuat sediaan krim menggunakan krim vehikulum sehingga didapatkan dosis krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% dan 10%. Krim Ekstrak *Centella asiatica* diaplikasikan dua kali sehari pada area kulit punggung tikus yang telah dipapar UVB selama 14 hari. *Centella asiatica* kering didapat dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Pembuatan krim

ekstrak *Centella asiatica* dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Unit : mg

Skala : Ordinal

4.3.2.2. Krim *Niacinamide*

Krim yang mengandung *Niacinamide* dengan dosis 5% diaplikasikan dua kali sehari selama 14 hari. Bahan baku *Niacinamide* murni diperoleh dari PT. Derma Konsep Estetika. Pembuatan krim *Niacinamide* 5% dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Unit : mg

Skala : Nominal

4.3.2.3. Ekspresi SMAD4

Ekspresi SMAD4 adalah jumlah keberadaan dan distribusi protein SMAD4 dalam sel/jaringan epidermis yang tampak sebagai warna kecoklatan dari hasil pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan dilakukan pada 4 lapang pandang menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan pembesaran 200x dan mikrofotografi menggunakan kamera Optilab pro serta hasil dianalisis menggunakan *software* ImageJ 1.54p dan dinyatakan dalam satuan persen.

Satuan : Persen Ekspresi

Skala : Rasio

4.3.2.4. Ekspresi Kolagen Tipe I

Ekspresi kolagen tipe I adalah jumlah keberadaan dan distribusi protein kolagen 1 (COL1A1) ditandai dengan munculnya warna kecoklatan dalam lapisan dermis kulit punggung tikus hasil pewarnaan imunohistokimia. Ekspresi kolagen tipe 1 dinyatakan dalam satuan persen berdasarkan jumlah area positif terhadap kolagen tipe I dibandingkan dengan total area jaringan yang diamati. Pengamatan dilakukan pada 4 lapang pandang menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan pembesaran 200x dan mikrofotografi menggunakan kamera Optilab pro, dimana hasilnya dianalisis menggunakan software ImageJ 1.54p.

Satuan : Persen Ekspresi

Skala : Rasio

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

1. Lampu Phillips narrowband UVB type PL-S 9W/01/2P
2. Homogenizer
3. Sentrifuge
4. Microplate reader
5. Timbangan analitik
6. pH meter

7. Vortex mixer
8. Mikroskop Olympus BX51
9. Kamera Optilab pro

4.4.2. Bahan

1. Ekstrak *Centella asiatica* (10gr)
2. Etanol 96%
3. *Cetyl Alcohol* dan *Stearic Acid*
4. Trietanolamin (TEA)
5. Propilen glikol
6. Metil paraben
7. Propil paraben
8. Minyak mineral atau minyak nabati (misal: minyak almond atau minyak zaitun)
9. Air Suling
10. Kit *Immunohistochemistry for Paraffin-Embedded Tissues*
11. Antibodi primer dan sekunder untuk SMAD4 dan Kolagen tipe I.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical Clearance penelitian diajukan ke komite bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan persetujuan etika yang berkaitan dengan studi penelitian ini secara

resmi disampaikan kepada komite etika Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret yang berlokasi di Surakarta.

4.5.2. Preparasi Ekstrak *Centella asiatica*

Ekstrak *Centella asiatica* diperoleh melalui maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 100-gram simplisia direndam dalam 1 liter etanol 96% selama 24 jam, kemudian disaring. Proses ini diulangi tiga kali. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental.

4.5.3. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak *Centella asiatica*

Pembuatan krim ekstrak *Centella asiatica* yaitu dengan penggunaan krim vehikulum standar yang kemudian ditambahkan ekstrak *Centella asiatica* 5% dan 10% dalam wadah terpisah yang telah disiapkan. Kemudian campuran tersebut terus diaduk hingga tercampur rata.

Tabel 4.1. Formula Krim Vehikulum ⁶⁴

Bahan	Formula Minyak dalam Air (%)
Asam stearat	15
Cetyl alkohol	4
Trietanolamin	1
Gliserin	8
Metil paraben	0,1
Propil paraben	0,05
Aquades	Ad 100

Pembuatan krim vehikulum dilakukan dengan meleburkan fase minyak yaitu asam stearat, setil alkohol, dan propil paraben diatas penangas air. Kemudian fase air yaitu trietanolamin, gliserin, metil

paraben dan aquades dipanaskan diatas penangas air. Dimasukkan fase minyak ke dalam mortir panas lalu ditambahkan fase air dan digerus hingga terbentuk krim vehikulum.

Pembuatan krim vehikulum dikerjakan di laboratorium farmasi Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Masing-masing dosis dibuat sebanyak 50 gram, untuk krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% menggunakan krim vehikulum sebanyak 47,5 gram ditambahkan ekstrak *Centella asiatica* sebanyak 2,5 gram sedangkan untuk krim Ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% menggunakan krim vehikulum sebanyak 45 gram dan ditambah Ekstrak *Centella asiatica* sebanyak 5 gram.

4.5.4. Penetapan Dosis

Dosis untuk pemberian topikal ekstrak *Centella asiatica* ditetapkan melalui tinjauan literatur yang ada. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis 10% ekstrak *Centella asiatica* menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan ^{6,59}. Studi tambahan menggunakan dosis 5% ⁵. Penelitian ini menerapkan dosis 5% dan 10% untuk aplikasi topikal ekstrak *Centella asiatica*.

4.5.5. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

Studi *photoaging* pada model tikus umumnya menggunakan paparan radiasi UVB dalam spektrum 290–315 nm dengan panjang

gelombang puncak 312 nm ^{71,72}, dosis 2 Minimal Erythema Dose (MED, 40–80 mJ/cm²) ⁷², serta sesi berulang selama beberapa minggu untuk menginduksi perubahan struktural pada kulit, termasuk degradasi kolagen ^{71,73}. Studi *photoaging* oleh Altman et al telah menerapkan standar Jarak paparan sejauh 27 cm ⁷⁴. Berdasarkan standar tersebut, penelitian ini menggunakan tikus Wistar yang dipaparkan UVB 312 nm pada jarak 27 cm, menerima 2 MED (40–80 mJ/cm²) selama 8 sesi dalam 14 hari, sesuai dengan protokol yang telah mapan. Berdasarkan standar tersebut:

1. Tikus menjalani periode aklimatisasi 7 hari setelah kedatangan di fasilitas penelitian.
2. Tikus menerima anestesi intramuskular melalui kombinasi ketamin (100mg/kgBB) dan xylazine (10mg/kgBB) dalam 0,5mL.
3. Bulu punggung tikus dipangkas dengan tepat menjadi persegi 4x4cm.
4. Daerah punggung tikus dipaparkan UVB pada jarak 27 cm, menerapkan 2 kali MED 40-80 mJ/cm² selama 30 menit 4 kali seminggu selama 14 hari.
5. Pemberian perlakuan krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% dan 10% selama 14 hari.

4.5.6. Pengambilan Sampel Jaringan

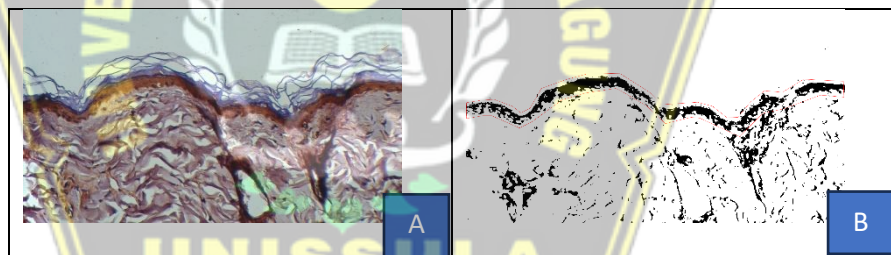
Pengambilan sampel kulit dilakukan pada hari ke-29. Tikus dianestesi menggunakan ketamin dan xylazine intraperitoneal (dosis

100 mg/kg BB dan 10 mg/kg BB). Area punggung yang telah diaplikasikan ekstrak dicuci dengan NaCl fisiologis. Setelah itu, tikus dieutanasia sesuai protokol etik, dan sampel jaringan kulit dari area perlakuan diambil untuk analisis lebih lanjut.

4.5.7. Analisis Ekspresi SMAD4 dan COL1 menggunakan Imunohistokimia (IHC) dan Software ImageJ 1.54p

Proses analisis jaringan dimulai dengan memperoleh sampel jaringan yang difiksasi menggunakan formalin dan diinkubasi dengan larutan parafin. Selanjutnya, jaringan dipotong menjadi irisan tipis menggunakan mikrotom, ditempatkan pada slide kaca, dan diproses melalui deparafinisasi dan rehidrasi dengan penghilangan parafin dari irisan jaringan menggunakan pelarut seperti xylol, diikuti dengan rehidrasi melalui larutan etanol. Langkah selanjutnya adalah pengambilan antigen untuk mengembalikan epitop yang terdenaturasi selama proses fiksasi untuk dapat berikatan antara antibodi dengan protein kompleks SMAD atau COL1. Setelah pengambilan antigen, slide diinkubasi dengan antibodi primer yang spesifik. Setelah inkubasi, slide dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat, dan kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim atau fluorokrom yang akan memberikan sinyal deteksi. Terakhir, slide diwarnai menggunakan substrat dan hasilnya dianalisis menggunakan mikroskop Olympus BX51 untuk

menentukan keberadaan dan distribusi protein dalam jaringan ⁴⁹. COL1 dan SMAD4 akan diamati di bawah mikroskop berdasarkan persentase areanya. Pada fase ini, kami akan melakukan pemilihan empat area jaringan dengan ekspresi kolagen tipe I dan SMAD4 yang tinggi ("high dense area") dan tidak saling tumpang tindih secara konsisten pada setiap kelompok untuk diambil gambarnya menggunakan kamera Optilab pro yang terhubung dengan mikroskop Olympus tersebut. Pengambilan gambar dilakukan dengan mempertimbangkan konsistensi dalam pencahayaan dan perbesaran mikroskop agar hasil yang diperoleh dapat dianalisis dengan baik.



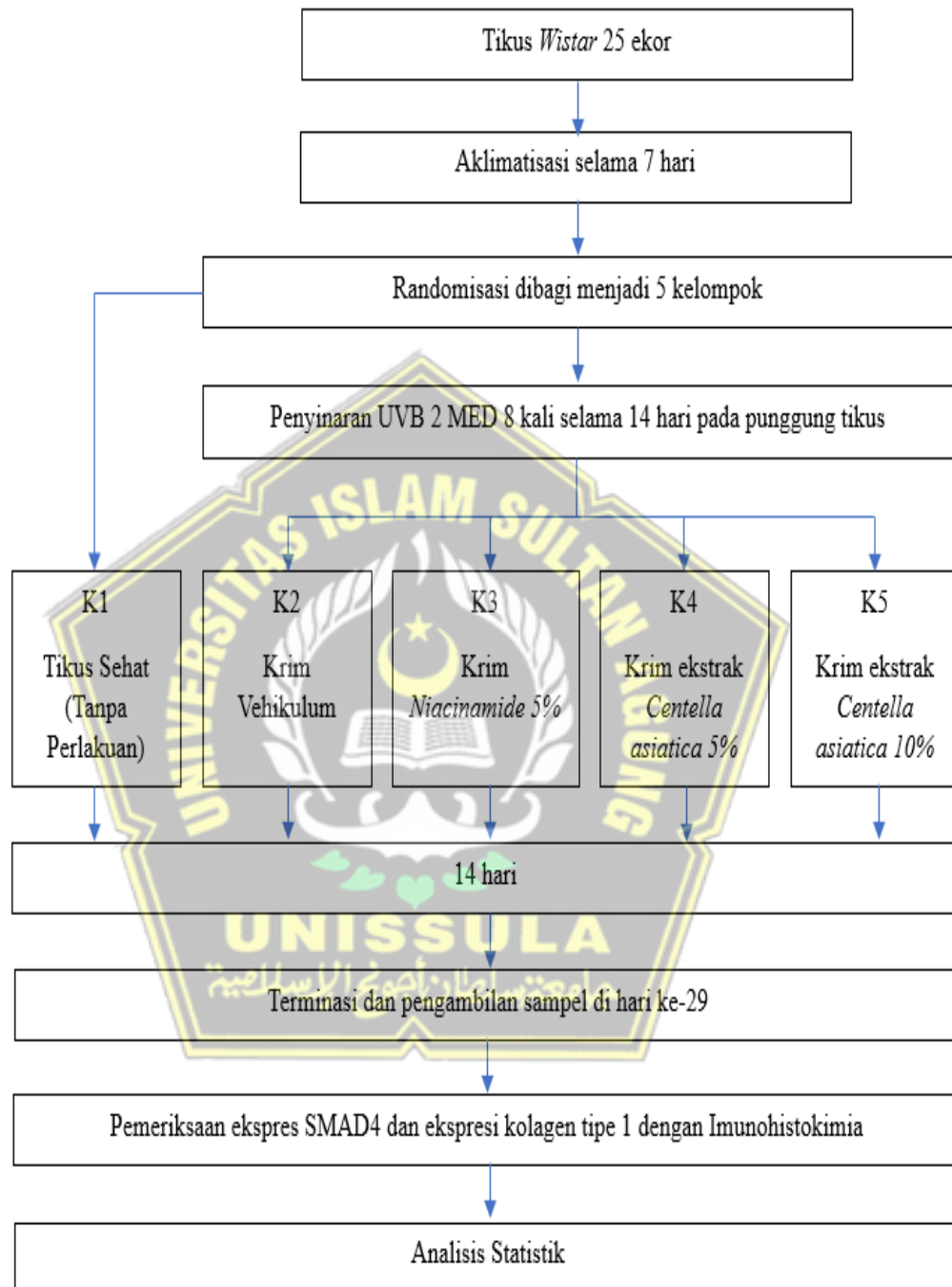
Gambar 4.2. (A) Gambar IHC Asli, dan (B) Hasil Thresholding Hitam-Putih.

Selanjutnya, gambar yang telah diambil dari masing-masing sampel dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ versi 1.54p. Proses ini dimulai dengan konversi gambar menjadi skala abu-abu untuk memudahkan analisis kuantitatif. Dengan menggunakan fungsi thresholding untuk memisahkan area positif (hitam) dari latar belakang (putih) sebelum diukur persentase areanya (Gambar 4.2), peneliti dapat membedakan COL1 dan SMAD4 dari latar belakang

jaringan. Area yang mengandung COL1 dan SMAD4 akan dihitung persentasenya terhadap total area jaringan dalam gambar tersebut ⁴¹. Persentase ini digunakan untuk menentukan ekspresi COL1 dan SMAD4 dalam setiap sampel. Setiap kelompok eksperimen dibandingkan untuk melihat pengaruh paparan UVB dan aplikasi krim ekstrak *Centella asiatica* terhadap ekspresi COL1 dan SMAD4. Pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Negeri Sebelas Maret (UNS) Surakarta.



4.6. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Juni - Oktober 2025. Pembuatan ekstrak dan topical cream dilakukan di laboratorium *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Jawa Tengah. Perawatan dan perlakuan hewan coba serta pembuatan preparat jaringan juga dilakukan di IBL Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Jawa Tengah. Pemeriksaan dan prosedur analisis imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Negeri Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

4.8. Analisa Data

1. Uji normalitas (e.g., *Shapiro-Wilk*) dan homogenitas varians (e.g., *Levene's test*) untuk semua variabel
2. Jika data terdistribusi normal dan homogen: *One-way* ANOVA untuk membandingkan ekspresi SMAD4 antar kelompok dan ekspresi kolagen tipe 1 antar kelompok kemudian *post-hoc test* (e.g., *Tukey's HSD*) jika *One-way* ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan
3. Jika data tidak memenuhi asumsi normalitas atau homogenitas maka menggunakan uji *Kruskal-Wallis* sebagai uji alternatif non-parametrik dilanjutkan dengan *Post-hoc Dunn's test* jika uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan.
4. Ambang batas untuk signifikansi statistik yang diterapkan dalam analisis ini ditetapkan pada $p < 0.05$. Pemrosesan dan analisis data dilakukan

dengan menggunakan Graphpad Prism versi 10.4.1 untuk sistem operasi Windows 11.

5. Interpretasi hasil dalam konteks pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap ekspresi SMAD4 dan ekspresi kolagen tipe 1 pada kerusakan kulit akibat paparan UVB.



BAB V

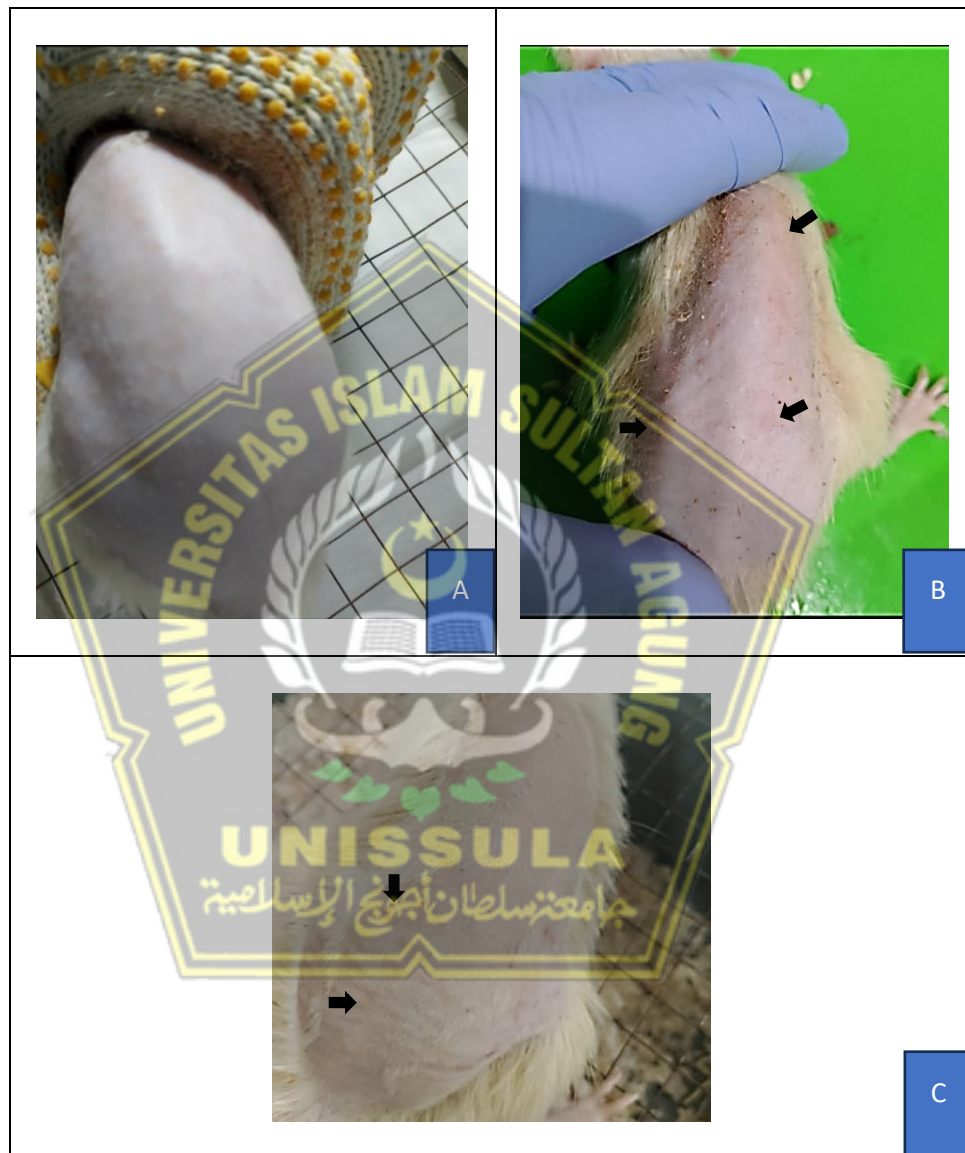
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Evaluasi Makroskopis Kulit Punggung Tikus

Evaluasi makroskopis dilakukan secara visual untuk mengamati perubahan kondisi kulit punggung tikus selama periode paparan UVB. Perubahan ini didokumentasikan secara fotografis pada kondisi awal (minggu ke-0), pertengahan (minggu ke-1), dan akhir (minggu ke-2) masa induksi (Gambar 4.1). Pada kondisi awal sebelum paparan UVB (Gambar 5.1A), kulit punggung tikus yang telah dicukur tampak sehat. Secara visual, kulit terlihat halus, elastis, dan berwarna putih-krem, tanpa adanya tanda-tanda lesi, kemerahan, atau hiperpigmentasi. Setelah paparan UVB selama satu minggu (Gambar 5.1B), mulai teramati tanda-tanda kerusakan kulit awal. Kulit menunjukkan adanya eritema ringan (kemerahan) dan munculnya beberapa bercak hiperpigmentasi (makula) yang kecil dan tersebar. Pada akhir minggu kedua paparan UVB (Gambar 5.1C), kerusakan kulit menjadi sangat jelas dan progresif. Dibandingkan dengan minggu pertama, bercak hiperpigmentasi menjadi jauh lebih banyak, ukurannya lebih besar, dan warnanya lebih pekat. Selain itu, kulit juga tampak lebih tebal, kasar, dan mulai menunjukkan kerutan halus (*wrinkling*), yang mengindikasikan terjadinya respons hiperkeratosis. Perubahan makroskopis yang

signifikan ini mengonfirmasi keberhasilan induksi model kerusakan kulit (*photoaging*) akibat paparan UVB sub-akut, sehingga hewan coba siap untuk dilanjutkan ke tahap perlakuan.



Gambar 5.1. Perubahan Makroskopis Kulit Punggung Tikus Selama Periode Induksi UVB. (A) Kondisi awal (Minggu ke-0) menunjukkan kulit sehat. (B) Minggu ke-1 menunjukkan eritema ringan dan bintik hiperpigmentasi awal. (C) Minggu ke-2 menunjukkan hiperpigmentasi berat dan penebalan kulit.

5.1.2. Hasil analisis ekspresi COL1 jaringan kulit pada tiap kelompok

Hasil analisis ekspresi Kolagen Tipe I pada jaringan kulit tikus disajikan pada Tabel 5.1. Rata-rata ekspresi pada kelompok tikus sehat tanpa paparan UVB (K1) adalah $71,56 \pm 34,55\%$. Kelompok tikus yang diberikan krim vehikulum dan dipaparkan UVB (K2) menunjukkan ekspresi sebesar $61,06 \pm 15,11\%$. Pada kelompok yang diberikan krim *niacinamide* 5% (K3), ekspresi tercatat sebesar $48,19 \pm 28,02\%$. Kelompok *Centella asiatica* dosis 5% (K4) memiliki ekspresi $66,69 \pm 30,06\%$, dan kelompok dosis 10% (K5) sebesar $72,52 \pm 7,593\%$.

Tabel 5. 1. Hasil analisis statistik ekspresi COL1

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi COL1 (%)						
Mean	71,56	61,06	48,19	66,69	72,52	
SD	$\pm 34,55$	$\pm 15,11$	$\pm 28,02$	$\pm 30,06$	$\pm 7,593$	
Shapiro-Wilk	0,0186*	0,9735	0,3827	0,0709	0,0154*	
Levene Test						0,43062
Kruskall Wallis						0,1554

Keterangan:

Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)

Levene Test : Homogen ($p > 0,05$)

Kruskal-Wallis : Signifikan ($p < 0,05$)

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan sebagian kelompok tidak berdistribusi normal, sehingga digunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,1554$ ($p > 0,05$), menandakan tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik antar kelompok perlakuan secara keseluruhan sehingga analisis statistik tidak dilanjutkan ke *Dunn's Post-hoc test*. Tren yang teramati secara

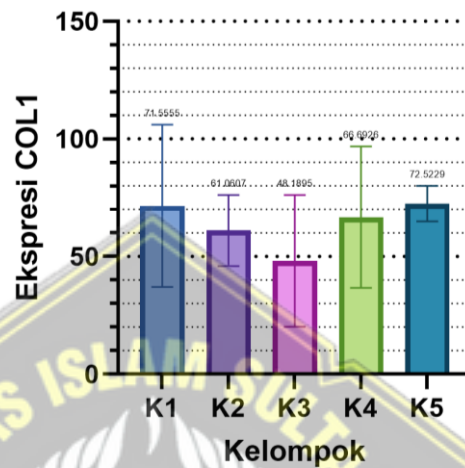
deskriptif dapat dilihat dari perbandingan nilai rerata \pm SD antar kelompok.

Paparan UVB (K2) menunjukkan rerata ekspresi ($61,06 \pm 15,11\%$) yang lebih rendah dibandingkan kelompok sehat (K1) ($71,56 \pm 34,55\%$). Efek dari perlakuan menunjukkan pola yang bervariasi. Kelompok *Niacinamide* (K3) menunjukkan rerata ekspresi ($48,19 \pm 28,02\%$) yang lebih rendah dibandingkan K2. Sebaliknya, kelompok *Centella asiatica* 10% (K5) menunjukkan rerata ekspresi yang lebih tinggi ($72,52 \pm 7,593\%$) dibandingkan K2. Kelompok *Centella asiatica* 5% (K4) menunjukkan rerata ($66,69 \pm 30,06\%$) yang relatif serupa dengan K2.

Perbandingan dengan kondisi sehat (K1) ($71,56 \pm 34,55\%$) menunjukkan bahwa beberapa perlakuan secara deskriptif tampak menormalkan ekspresi. Rerata ekspresi pada kelompok *Centella asiatica* 10% (K5) ($72,52 \pm 7,593\%$) dan 5% (K4) ($66,69 \pm 30,06\%$) secara deskriptif tidak berbeda jauh dari kondisi sehat (K1). Sebaliknya, kelompok *Niacinamide* (K3) ($48,19 \pm 28,02\%$) masih menunjukkan rerata yang lebih rendah dibandingkan kelompok sehat.

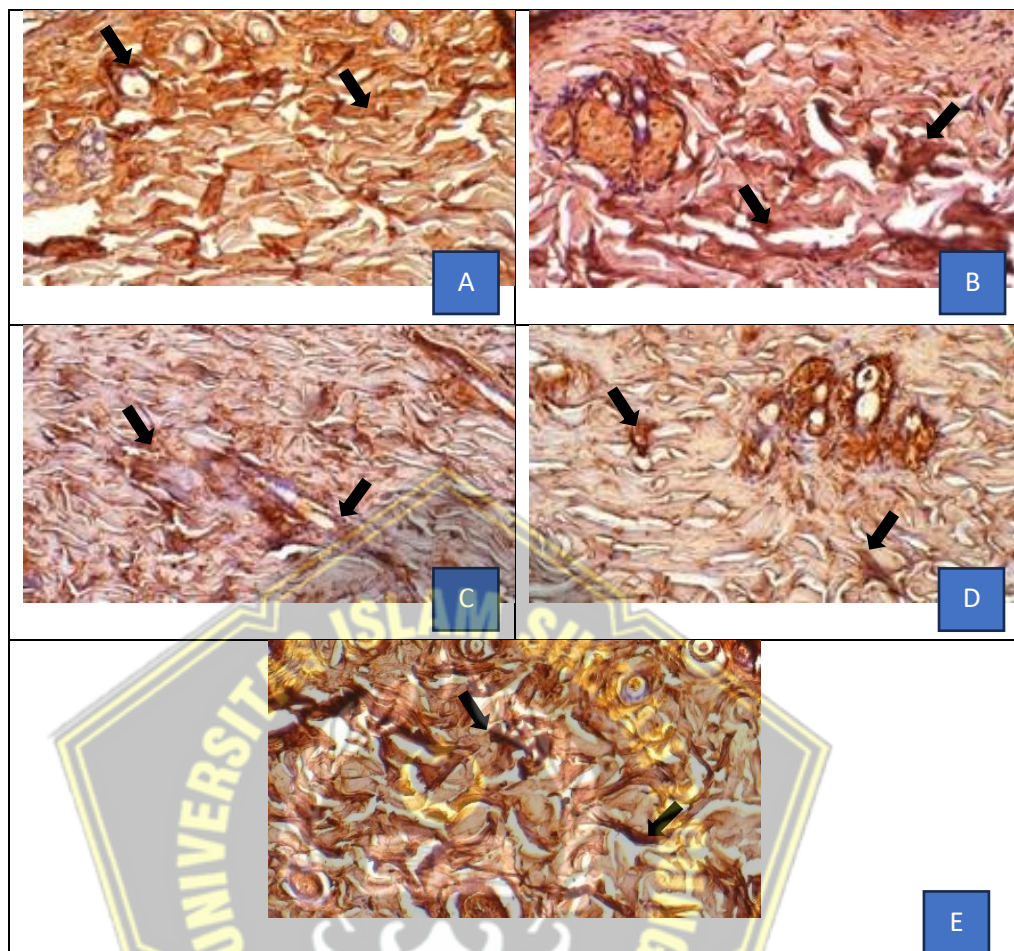
Perbedaan yang paling kontras terlihat pada perbandingan langsung antar perlakuan. Kelompok *Centella asiatica* 10% (K5) menunjukkan rerata ekspresi ($72,52 \pm 7,593\%$) yang jauh lebih tinggi dibandingkan kelompok *Niacinamide* (K3) ($48,19 \pm 28,02\%$).

Perbedaan rerata juga teramati antara K3 dan K4 ($66,69 \pm 30,06$), sementara perbandingan antar dosis *Centella asiatica* (K4 vs K5) menunjukkan rerata yang relatif berdekatan.



Gambar 5.1. Grafik rata-rata ekspresi COL1 setiap kelompok perlakuan

Untuk memberikan gambaran visual dari ekspresi COL1 pada jaringan kulit, gambar representatif dari setiap kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.2. Gambaran Histopatologi Ekspresi COL1 pada Jaringan Kulit Tikus. Pewarnaan Imunohistokimia (IHC) dengan perbesaran 200x. Tanda panah menunjukkan area ekspresi positif (coklat). (A) Kelompok Sehat (K1), (B) Kelompok Kontrol UVB (K2), (C) Kelompok Niacinamide (K3), (D) Kelompok Centella asiatica 5% (K4), (E) Kelompok Centella asiatica 10% (K5).

5.1.3. Hasil Analisis Ekspresi SMAD4 Jaringan Kulit pada Tiap Kelompok

Hasil analisis ekspresi SMAD4 pada jaringan kulit tikus disajikan pada Tabel 5.2. Rata-rata ekspresi pada kelompok sehat (K1) adalah $20,31 \pm 15,90\%$. Kelompok yang diberikan krim vehikulum dan dipaparkan UVB (K2) menunjukkan ekspresi sebesar $34,95 \pm 16,29\%$. Pada kelompok *niacinamide* 5% (K3), ekspresi

tercatat sebesar $28,31 \pm 21,79\%$. Kelompok *Centella asiatica* dosis 5% (K4) memiliki ekspresi tertinggi yaitu $49,96 \pm 14,68\%$, sedangkan kelompok dosis 10% (K5) sebesar $26,29 \pm 28,19\%$.

Tabel 5. 2 Hasil analisis statistik ekspresi SMAD4

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi SMAD4 (%)						
Mean	20,31	34,95	28,31	49,96	26,29	
SD	$\pm 15,90$	$\pm 16,29$	$\pm 21,79$	$\pm 14,68$	$\pm 28,19$	
Shapiro-Wilk	0,9740	0,3534	0,7019	0,4690	0,4661	
Levene Test						0,64601
One way ANOVA						0,2121

Keterangan:

Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)

Levene Test : Homogen ($p > 0,05$)

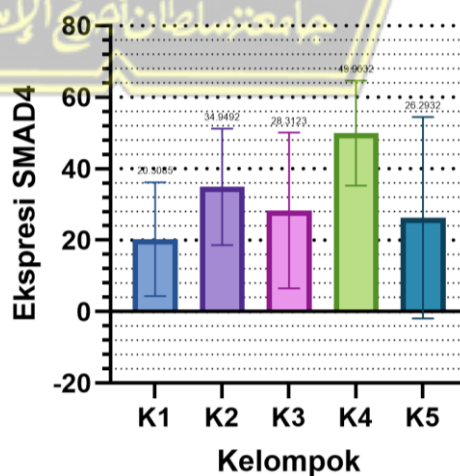
One way ANOVA: Signifikan ($p < 0,05$)

Hasil rata-rata ekspresi SMAD4 dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians menggunakan *Levene Test*. Seluruh kelompok memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Oleh karena itu, digunakan uji *one way ANOVA* yang menghasilkan $p = 0,2121$ ($p > 0,05$), menandakan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok sehingga analisis statistik tidak dilanjutkan ke *Tukey's Post-hoc test*.

Paparan UVB (K2) menunjukkan rerata ekspresi ($34,95 \pm 16,29\%$) yang lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat (K1) ($20,31 \pm 15,90\%$). Efek dari perlakuan menunjukkan pola yang kompleks. Kelompok *Centella asiatica* 5% (K4) secara mencolok menunjukkan rerata ekspresi tertinggi ($49,96 \pm 14,68\%$). Perbandingan K1 (sehat) dengan K4 menunjukkan rerata K4 lebih tinggi. Demikian pula,

perbandingan K2 (kontrol UVB) dengan K4 juga menunjukkan rerata K4 lebih tinggi.

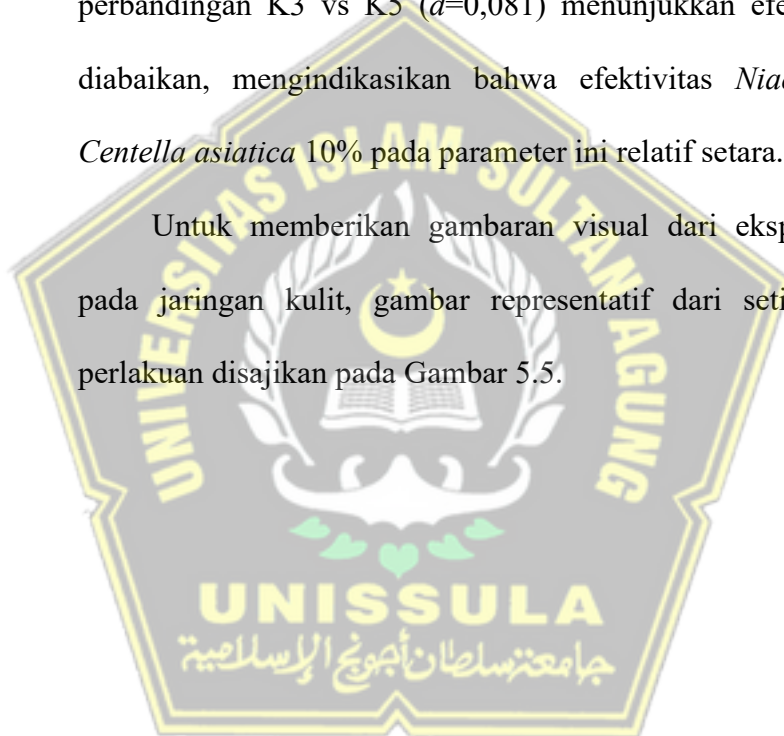
Sebaliknya, kelompok perlakuan lain seperti *Niacinamide* (K3) ($28,31 \pm 21,79\%$) dan *Centella asiatica* 10% (K5) ($26,29 \pm 28,19\%$) menunjukkan tren rerata yang lebih rendah dibandingkan kelompok K2 ($34,95 \pm 16,29\%$). Jika dibandingkan dengan kondisi sehat (K1: $20,31 \pm 15,90\%$), rerata ekspresi pada kelompok K3 (*Niacinamide*) dan K5 (*Centella asiatica* 10%) tampak tidak berbeda jauh. Perbedaan paling dramatis terlihat pada perbandingan langsung antar dosis *Centella asiatica*. Perbandingan antara K4 ($49,96 \pm 14,68\%$) dan K5 ($26,29 \pm 28,19\%$) menunjukkan rerata K4 jauh lebih tinggi. Perbandingan antar perlakuan lain seperti K3 ($28,31 \pm 21,79\%$) vs K4 ($49,96 \pm 14,68\%$) juga menunjukkan rerata K4 lebih tinggi. Sementara itu, perbandingan K3 vs K5 menunjukkan rerata yang relatif setara.

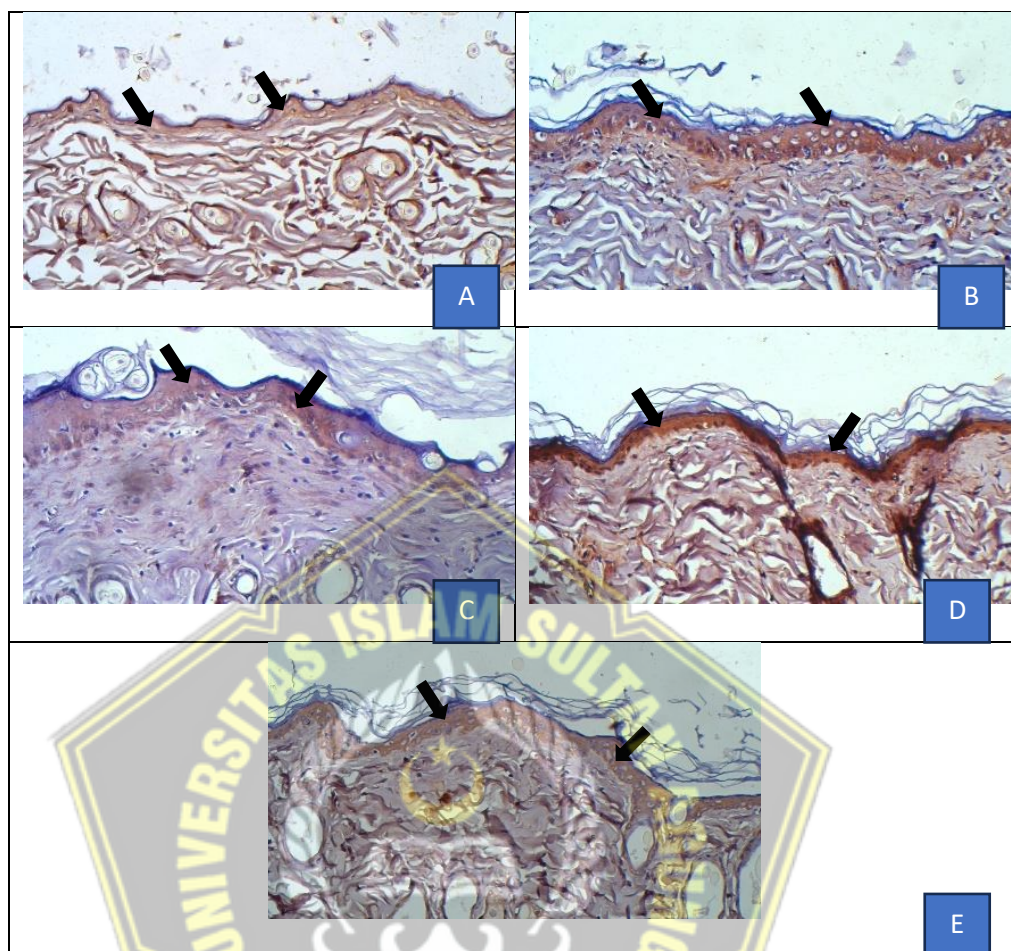


Gambar 5.3. Grafik rata-rata ekspresi SMAD4 setiap kelompok perlakuan

Perbedaan paling dramatis terlihat pada perbandingan langsung antar dosis *Centella asiatica*. Perbandingan antara K4 dan K5 menunjukkan ukuran efek yang sangat besar ($d=1,053$), yang secara kuantitatif mengonfirmasi adanya respons yang sangat bergantung pada dosis. Perbandingan antar perlakuan lain seperti K3 vs K4 ($d=1,165$) juga menunjukkan efek yang sangat besar, sementara perbandingan K3 vs K5 ($d=0,081$) menunjukkan efek yang dapat diabaikan, mengindikasikan bahwa efektivitas *Niacinamide* dan *Centella asiatica* 10% pada parameter ini relatif setara.

Untuk memberikan gambaran visual dari ekspresi SMAD4 pada jaringan kulit, gambar representatif dari setiap kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 5.5.





Gambar 5.4. Gambaran Histopatologi Ekspresi SMAD4 pada Jaringan Kulit Tikus. Pewarnaan Imunohistokimia (IHC) dengan perbesaran 200x. Tanda panah menunjukkan area ekspresi positif (coklat). (A) Kelompok Sehat (K1), (B) Kelompok Kontrol UVB (K2), (C) Kelompok Niacinamide (K3), (D) Kelompok Centella asiatica 5% (K4), (E) Kelompok Centella asiatica 10% (K5).

5.2. Pembahasan

Hasil penelitian untuk parameter ekspresi Kolagen Tipe I dan SMAD4 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik antar kelompok ($p > 0,05$). Seperti yang terlihat pada Gambar 5.2 dan 5.4, secara deskriptif tampak adanya perbedaan rerata antar kelompok. Namun, hasil uji ANOVA/Kruskal-Wallis menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna secara statistik (masing-masing $p = 0,1554$ dan $p = 0,2121$).

Tidak adanya signifikansi statistik ini kemungkinan besar disebabkan oleh tingginya variabilitas data antar-sampel, yang merupakan masalah umum dalam proses pengukuran Imunohistokimia (IHC). Sesuai dengan penelitian metodologi oleh O'Hurley *et al.* tahun 2014 bahwa variabilitas yang tinggi dalam pewarnaan IHC dapat menutupi perbedaan biologis yang nyata dan meningkatkan risiko kesalahan Tipe II. Oleh karena itu, interpretasi temuan ini harus berfokus pada tren biologis yang teramati secara konsisten ⁷⁵.

Pada parameter ekspresi Kolagen Tipe I, paparan UVB (K2) secara deskriptif menunjukkan rerata ekspresi yang sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok sehat (K1). Hal ini mengindikasikan bahwa dalam model paparan sub-akut ini, kerusakan utama mungkin belum berupa degradasi masif dari kolagen struktural utama, melainkan lebih pada disorganisasi matriks dan dimulainya respons perbaikan yang tidak teratur.

Temuan yang paling mencolok terlihat pada kelompok perlakuan. Kelompok *Niacinamide* (K3) yang menunjukkan rerata ekspresi COL1 terendah di antara semua kelompok. Rerata ekspresi pada kelompok ini tampak masih berbeda dari kondisi normal (K1). Hal ini menunjukkan *Niacinamide* mungkin memiliki peran modulasi yang kompleks. Sesuai dengan penelitian dermatologi oleh Bissett *et al.* tahun 2005 bahwa *Niacinamide*, sebagai agen anti-inflamasi poten, kemungkinan besar menekan tidak hanya jalur inflamasi tetapi juga sinyal-sinyal perbaikan

secara umum pada fase sub-akut ini, sehingga proses sintesis kolagen baru menjadi lebih lambat pada titik pengukuran ini ⁷⁶.

Sebaliknya, kelompok *Centella asiatica* 10% (K5) menunjukkan rerata ekspresi COL1 tertinggi secara deskriptif dimana nilai ekspresi COL1 hampir kembali ke level kelompok sehat (K1). Temuan ini mengisyaratkan bahwa *Centella asiatica* 10% tidak hanya mencegah degradasi, tetapi kemungkinan memiliki efek pro-sintesis kolagen yang dominan. Sesuai dengan penelitian biologi sel oleh Bylka *et al.* tahun 2013 bahwa senyawa triterpenoid dalam *Centella asiatica* diketahui memiliki kemampuan menstimulasi aktivitas dan sintesis fibroblas secara langsung ⁷⁷.

Perbedaan mekanisme antara kedua agen protektif ini digarisbawahi oleh perbandingan langsung antara K3 (*Niacinamide*) dan K5 (*Centella asiatica* 10%), yang menunjukkan tren rerata yang berlawanan. Temuan ini menunjukkan bahwa kedua perlakuan tersebut memiliki dampak yang berbeda pada ekspresi Kolagen Tipe I dalam jangka waktu penelitian ini. Sementara itu, dosis 5% *Centella asiatica* (K4) tidak menunjukkan tren yang menonjol pada parameter ini, memperkuat hipotesis adanya respons yang sangat bergantung pada dosis.

Pada parameter SMAD4, yang merepresentasikan aktivasi jalur sinyal TGF- β utama, paparan UVB pada kelompok K2 menunjukkan tren ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat (K1). Hal ini secara biologis konsisten. Sesuai dengan penelitian onkologi kulit oleh Quan *et al.* tahun 2010 bahwa stres akibat UVB memang diketahui memicu aktivasi jalur

sinyal perbaikan jaringan melalui TGF- β /SMAD sebagai respons protektif awal⁷⁸.

Respons terhadap perlakuan menunjukkan pola yang kompleks dan variatif. Temuan yang paling menonjol terlihat pada kelompok *Centella asiatica* 5% (K4), yang memperlihatkan lonjakan rerata ekspresi SMAD4 tertinggi di antara seluruh kelompok. Temuan ini mengindikasikan bahwa *Centella asiatica* 5% berpotensi menjadi aktivator kuat jalur perbaikan TGF- β /SMAD. Sesuai dengan penelitian fitoterapi oleh Incandela *et al.* tahun 2001 bahwa madecassoside dari *Centella asiatica* menginduksi aktivasi jalur TGF- β /SMAD pada fibroblas, memperkuat dugaan bahwa aktivasi SMAD4 mungkin merupakan bagian dari respons homeostatik anti-inflamasi sekaligus reparatif⁷⁹.

Sebaliknya, kelompok perlakuan *Niacinamide* 5% (K3) dan *Centella asiatica* 10% (K5) menunjukkan tren rerata ekspresi SMAD4 yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol UVB (K2). Tingkat ekspresi SMAD4 pada kedua kelompok perlakuan tersebut cenderung mendekati pola ekspresi normal (K1), menunjukkan bahwa kedua perlakuan tersebut tidak memberikan modulasi aktivasi yang kuat terhadap jalur ini.

Perbedaan mekanisme yang bergantung pada dosis dari *Centella asiatica* semakin ditegaskan oleh perbandingan antara K4 (yang menunjukkan lonjakan rerata) dan K5 (yang mendekati normal). Temuan ini menegaskan bahwa modulasi ekspresi SMAD4 bersifat spesifik pada

konsentrasi 5%, sedangkan efek tersebut tidak lagi teramati pada konsentrasi 10%.

Namun, perlu dicatat bahwa aktivasi SMAD4 yang tinggi tidak selalu berkorelasi linier dengan peningkatan sintesis kolagen, karena dapat memicu mekanisme efek balik negatif melalui induksi SMAD7 yang menghambat sinyal TGF- β secara keseluruhan. Sesuai dengan penelitian biologi sinyal TGF- β oleh Quan *et al.* tahun 2004 bahwa SMAD7 berfungsi sebagai *negative feedback* kritis yang membatasi amplitudo dan durasi respons TGF- β , sehingga mencegah akumulasi kolagen berlebih meskipun SMAD4 tinggi. Hal ini menjelaskan tren kontras yang teramati pada kelompok K4 (lonjakan SMAD4 tapi tidak diikuti peningkatan COL1 secara signifikan) ⁸⁰.

Perbandingan antarperlakuan lain, seperti antara K3 (*Niacinamide* 5%) dan K4 (*Centella* 5%), juga menunjukkan perbedaan tren yang jelas, yang semakin memperkuat keunikan respons biologis kelompok K4. Sebaliknya, perbandingan K3 dengan K5 menunjukkan tren rerata yang serupa, mengindikasikan bahwa pada parameter SMAD4, efektivitas *Niacinamide* 5% dan *Centella asiatica* 10% secara deskriptif relatif setara.

5.3. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu dipertimbangkan. Keterbatasan utama terletak pada aspek statistik, di mana variabilitas data yang tinggi, terutama pada pengukuran IHC, secara signifikan membatasi kemampuan penelitian untuk mendeteksi perbedaan

antar kelompok secara statistik dan meningkatkan risiko *Type II error*. Sesuai dengan penelitian metodologi imunohistokimia oleh O'Hurley *et al.* tahun 2014 bahwa variabilitas antar-sampel pada pewarnaan IHC sering menutupi perbedaan biologis yang nyata, sehingga meningkatkan probabilitas *false negative* hingga >50% ⁷⁴.

Keterbatasan penelitian ini juga terletak pada metode kuantifikasi imunohistokimia (IHC). Pengukuran ekspresi protein (COL1, SMAD4) hanya didasarkan pada persentase area positif (% Area) yang diperoleh dari *thresholding biner* pada ImageJ. Metode ini tidak memperhitungkan intensitas pewarnaan (misalnya, perbedaan antara ekspresi lemah, sedang, dan kuat). Akibatnya, data mengenai tingkat atau kekuatan ekspresi protein per area tidak tertangkap, dan analisis yang lebih bernuansa seperti *H-Score* atau *Optical Density* tidak dapat dilakukan. Hal ini dapat menutupi perbedaan biologis yang mungkin ada jika dua kelompok memiliki % Area yang sama tetapi intensitas ekspresi yang berbeda. Sesuai dengan penelitian analisis citra IHC oleh Varghese *et al.* tahun 2014 bahwa *thresholding biner* untuk % area gagal menangkap variasi intensitas pewarnaan, sehingga mengurangi sensitivitas deteksi perbedaan biologis dan merekomendasikan metode seperti H-Score untuk evaluasi kuantitatif yang lebih akurat ⁸¹. Sesuai dengan penelitian kuantifikasi histologi oleh Jensen tahun 2013 bahwa penggunaan *thresholding* sederhana di ImageJ tanpa koreksi intensitas dapat menyebabkan interpretasi data yang bias, karena tidak membedakan gradien ekspresi protein ⁸².

Dari segi desain eksperimental, penggunaan hanya dua konsentrasi (*Centella asiatica* 5% dan 10%) belum cukup untuk memetakan secara detail respons yang bergantung pada dosis, seperti yang teramati secara kontras pada ekspresi SMAD4. Sesuai dengan penelitian farmakodinamik herbal oleh Agathokleous & Calabrese tahun 2020 bahwa kurva *hormetic dose-response* memerlukan minimal 5 titik dosis dengan interval seragam untuk mengidentifikasi *maximum stimulatory response* dan *transition point* secara akurat ⁸³.

Keterbatasan parameter mekanistik juga perlu dicatat, di mana pengukuran yang dilakukan belum memberikan gambaran utuh tentang kualitas remodeling matriks atau aktivasi jalur sinyal secara keseluruhan. Sesuai dengan penelitian biologi *photoaging* oleh Rittié & Fisher tahun 2005 bahwa evaluasi lengkap *extracellular matrix remodeling* seharusnya mencakup rasio ekspresi COL1:COL3, rasio kadar MMP-1:TIMP-1, serta aktivasi jalur TGF- β /SMAD secara simultan untuk menilai kualitas struktural dan fungsional ⁸⁴.

Tidak adanya protokol terminasi yang detail (contohnya apakah tikus dianestesi masal dulu sebelum diterminasi satu per satu, atau anestesi terminasi bergiliran) memungkinkan adanya kelemahan dalam proses terminasi yang berpotensi menciptakan faktor pengganggu berupa stres pada tikus pre-terminasi. Sesuai dengan pedoman etika hewan oleh *National Research Council* tahun 2011 bahwa prosedur terminasi yang tidak terstandarisasi dapat menginduksi pelepasan kortikosteron dan katekolamin,

yang secara signifikan mengubah ekspresi protein target seperti COL1 dan SMAD4 pada sampel *post-mortem* ⁸⁵.

Terakhir, formulasi krim standar yang digunakan pada penelitian ini menjadi suatu keterbatasan, di mana penyerapan bahan aktif mungkin kurang optimal dan dapat menyebabkan variabilitas hasil. Sesuai dengan penelitian farmasi topikal oleh Nastiti *et al.* tahun 2017 bahwa formulasi krim sederhana tanpa *penetration enhancer* atau sistem *nano-delivery* sering menghasilkan bioavailabilitas <20% pada kulit tikus, sehingga memengaruhi konsistensi efek terapeutik ⁸⁶.



BAB VI

KESIMPULAN

6.1. Kesimpulan

1. Pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5% dan 10% secara topikal 2 kali sehari selama 14 hari tidak berpengaruh terhadap ekspresi SMAD4 pada tikus wistar yang dipapar UVB.
2. Pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5% dan 10% secara topikal 2 kali sehari selama 14 hari tidak berpengaruh terhadap ekspresi Kolagen tipe 1 pada tikus wistar yang dipapar UVB.

6.2. Saran

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menambah jumlah sampel (n) per kelompok guna meningkatkan kekuatan statistik dan mengurangi risiko Type II error. Untuk mengatasi variabilitas inheren pada metode IHC, disarankan pula untuk memperbanyak jumlah lapang pandang yang dianalisis per preparat dan, jika memungkinkan, melakukan validasi silang (*cross-validation*) menggunakan metode kuantifikasi lain seperti *Western Blot* atau qPCR.
2. Menanggapi keterbatasan pada metode kuantifikasi IHC, penelitian selanjutnya disarankan untuk tidak hanya mengandalkan *thresholding* biner untuk persentase area (% Area). Untuk mendapatkan data yang lebih akurat, disarankan untuk menerapkan metode kuantifikasi yang turut memperhitungkan intensitas pewarnaan. Metode yang sangat

direkomendasikan adalah *H-Score (Histoscore)*, yang mengkombinasikan persentase sel positif dengan skor intensitas (misalnya 0 untuk negatif, 1+ untuk lemah, 2+ untuk sedang, 3+ untuk kuat). Alternatif lain adalah menggunakan analisis *Mean Optical Density (OD)*. Penggunaan metode ini akan memungkinkan kuantifikasi gradien ekspresi sehingga memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai jumlah total ekspresi protein, mengurangi risiko bias interpretasi, dan meningkatkan sensitivitas untuk mendeteksi perbedaan biologis antar kelompok.

3. Untuk memetakan respons bifasik yang teramati, penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan rentang konsentrasi *Centella asiatica* yang lebih luas dan bervariasi. Sesuai dengan literatur mengenai *dose-response*, disarankan untuk menggunakan minimal lima titik dosis (misalnya 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%) agar dapat mengidentifikasi titik stimulasi maksimum dan titik transisi efektivitas secara akurat.
4. Guna mendapatkan gambaran utuh mengenai kualitas remodeling matriks, penelitian selanjutnya sebaiknya tidak hanya mengukur ekspresi kolagen secara terpisah. Disarankan untuk menganalisis parameter tambahan yang lebih komprehensif, seperti rasio Kolagen Tipe I : Kolagen Tipe III (COL1:COL3), serta mengukur kadar Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) dan inhibitor-nya (TIMP-1) untuk menilai keseimbangan antara sintesis dan degradasi matriks secara fungsional.
5. Penelitian selanjutnya harus merancang dan merinci protokol terminasi hewan yang terstandarisasi untuk meminimalisir stres pre-terminasi

sebagai variabel perancu. Disarankan untuk merinci prosedur anestesi (misalnya, anestesi dalam *chamber* secara simultan sebelum terminasi satu per satu dengan dislokasi servikal) guna memastikan tidak ada pelepasan hormon stres yang dapat memengaruhi ekspresi protein target.

6. Untuk menjamin bioavailabilitas dan penyerapan bahan aktif yang lebih optimal dan konsisten, penelitian selanjutnya disarankan untuk mengeksplorasi formulasi sediaan topikal yang lebih canggih. Penggunaan *penetration enhancer* atau sistem penghantaran berbasis teknologi nano (seperti *nanoemulsion* atau *liposome*) dapat dipertimbangkan untuk meningkatkan efikasi terapeutik ekstrak *Centella asiatica* pada jaringan kulit.



DAFTAR PUSTAKA

1. Tobin DJ. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability* 2017; 26(1): 37-46.
2. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New England Journal of Medicine* 1997; 337(20): 1419-1428.
3. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatologii i Alergologii* 2013; 30(1): 46-49.
4. Sari L. Efek Pemberian Krim Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Interleukin-1 α (IL-1 α) dan Jumlah Sel Sunburn pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Paparan Sinar Ultraviolet-B. [Tesis]. Universitas Brawijaya; 2024.
5. Rahmawati YD, Widjajanto E, Endharti AT. The Potency of *Centella asiatica* to Increase TGF- β 1 and Decrease Malondialdehyde in Skin Fibroblast Cells after Ultraviolet B Exposure. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* 2019; 7(5): 122-127.
6. Purmawanti E, Astuti I, Hidayat M. The Effect of *Centella asiatica* Extract Cream in Inhibiting Matrix Metalloproteinase-1 Expression and Increasing Collagen Density in *Photoaging* Model. [Tesis]. Universitas Brawijaya; 2024.
7. Rahmayati R. Efek Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi TGF- β dan TNF- α pada Tikus BALB/c yang Diinduksi Sinar UVB. [Tesis]. Universitas Brawijaya; 2024.
8. Park KS. Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 1–8.
9. Kk A. *Centella asiatica* (L.) urban: A review on panoramic exploration of medicinal marvels for health and healing. *Int J Adv Acad Stud* 2020; 2: 369–372.
10. Shen X, Guo M, Yu H, *et al.* Propionibacterium acnes related anti-inflammation and skin hydration activities of madecassoside, a pentacyclic triterpene saponin from *Centella asiatica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2019; 83: 561–568.
11. Damayanti, Menul Ayu Umborowati, Sylvia Anggraeni², *et al.* The Role of Aloe vera and *Centella asiatica* to the Improvement of Skin Barrier Function

- in Indonesian Batik Workers. *Indian J Forensic Med Toxicol* 2021; 15: 2805–2811.
12. Sun B, Wu L, Wu Y, *et al.* Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Front Pharmacol* 2020; 11: 568032.
 13. Bandopadhyay S, Mandal S, Ghorai M, *et al.* Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review. *J Cell Mol Med* 2023; 27: 593–608.
 14. Buranasudja V, Rani D, Malla A, *et al.* Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Sci Rep* 2021; 11: 13459.
 15. Frida M, Mwangengwa L, Ally M. Excision wounds healing activity of *Centella asiatica* (Gotukola) extract on laboratory rats. *Tanzan J Health Res.*
 16. Fodor L, Dumitrascu D. Skin Anatomy. In: Fodor L, Ullmann Y (eds) *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–12.
 17. Lotfollahi Z. The anatomy, physiology and function of all skin layers and the impact of ageing on the skin. *Wound Pract Res*; 32. Epub ahead of print March 2024. DOI: 10.33235/wpr.32.1.6-10.
 18. Betts JG, Young KA, Wise JA, *et al.* Ch. 3 Introduction - Anatomy and Physiology | OpenStax, <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/3-introduction> (2013, accessed 8 March 2025).
 19. Ansary TM, Hossain MdR, Kamiya K, *et al.* Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 3974.
 20. Tang X, Yang T, Yu D, *et al.* Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: Friends and foes to the skin and beyond the skin. *Environ Int* 2024; 185: 108535.
 21. Moreau JM, Dhariwala MO, Gouirand V, *et al.* Regulatory T cells promote innate inflammation after skin barrier breach via TGF- β activation. *Sci Immunol* 2021; 6: eabg2329.
 22. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, *et al.* The impact of ultraviolet radiation on skin *photoaging* — review of *in vitro* studies. *J Cosmet Dermatol* 2021; 20: 3427–3431.
 23. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, *et al.* UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 12222–12248.

24. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, *et al.* Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 137823.
25. Deng Z, Fan T, Xiao C, *et al.* TGF- β signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9: 61.
26. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 790–811.
27. Tie Y, Tang F, Peng D, *et al.* TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Mol Biomed* 2022; 3: 45.
28. Zhang T, Wang X-F, Wang Z-C, *et al.* Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /SMAD signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother* 2020; 129: 110287.
29. Nagaraj NS, Datta PK. Targeting the transforming growth factor- β signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 77–91.
30. Nakao A, Afrakhte M, Morn A, *et al.* Identification of SMAD7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 1997; 389: 631–635.
31. Li F, Bian L, Iriyama S, *et al.* SMAD7 Ameliorates TGF- β -Mediated Skin Inflammation and Associated Wound Healing Defects but Not Susceptibility to Experimental Skin Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2019; 139: 940–950.
32. Chin T, Lee XE, Ng PY, *et al.* The role of cellular senescence in skin aging and age-related skin pathologies. *Front Physiol* 2023; 14: 1297637.
33. Yuan W, Varga J. Transforming Growth Factor- β Repression of Matrix Metalloproteinase-1 in Dermal Fibroblasts Involves SMAD3. *J Biol Chem* 2001; 276: 38502–38510.
34. Chen P-Y, Qin L, Simons M. TGF β signaling pathways in human health and disease. *Front Mol Biosci* 2023; 10: 1113061.
35. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Human Skin Keratinocytes on Sustained TGF- β Stimulation Reveal Partial EMT Features and Weaken Growth Arrest Responses. *Cells* 2020; 9: 255.
36. Ke Y, Wang X-J. TGF β Signaling in *Photoaging* and UV-Induced Skin Cancer. *J Invest Dermatol* 2021; 141: 1104–1110.
37. Kim B-G, Malek E, Choi SH, *et al.* Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *J Hematol Oncol* 2021; 14: 55.

38. Massagué J, Sheppard D. TGF- β signaling in health and disease. *Cell* 2023; 186: 4007–4037.
39. Ham SM, Song MJ, Yoon H-S, *et al.* SPARC Is Highly Expressed in Young Skin and Promotes Extracellular Matrix Integrity in Fibroblasts via the TGF- β Signaling Pathway. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 12179.
40. Widjiati, Boediono A, Sumitro SB, *et al.* Isolation and Identification of Transforming Growth Factor β from *In vitro* Matured Cumulus Oocyte Complexes. *HAYATI J Biosci* 2012; 19: 6–10.
41. Liu L, Liu X, Ren X, *et al.* SMAD2 and SMAD3 have differential sensitivity in relaying TGF β signaling and inversely regulate early lineage specification. *Sci Rep* 2016; 6: 21602.
42. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I. A mechanism of repression of TGF β /SMAD signaling by oncogenic Ras.
43. Boby N, Ransom A, Pace BT, *et al.* Enhanced Intestinal TGF- β /SMAD-Dependent Signaling in Simian Immunodeficiency Virus Infected Rhesus Macaques. *Cells* 2021; 10: 806.
44. Dituri F, Mazzocca A, Peidrò FJ, *et al.* Differential Inhibition of the TGF- β Signaling Pathway in HCC Cells Using the Small Molecule Inhibitor LY2157299 and the D10 Monoclonal Antibody against TGF- β Receptor Type II. *PLoS ONE* 2013; 8: e67109.
45. Hawinkels LJAC, Verspaget HW, Van Duijn W, *et al.* Tissue level, activation and cellular localisation of TGF- β 1 and association with survival in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 398–404.
46. Li M, He N, Sun R, *et al.* Expression and Polymorphisms of SMAD1, SMAD2 and SMAD3 Genes and Their Association with Litter Size in Tibetan Sheep (*Ovis aries*). *Genes* 2022; 13: 2307.
47. Fan C, El Andaloussi S, Lehto T, *et al.* SMAD-binding decoy reduces extracellular matrix expression in human hypertrophic scar fibroblasts. *Mol Med Rep* 2020; 22: 4589–4600.
48. Zilberberg L, ten Dijke P, Sakai LY, *et al.* A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biol* 2007; 8: 41.
49. IUCN. *Centella asiatica*: Lansdown, R.V.: The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T168725A88308182. Epub ahead of print 17 April 2018. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T168725A88308182.en.
50. Lopresti AL. Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs RD* 2017; 17: 53–64.

51. Gray NE, Alcazar Magana A, Lak P, *et al.* *Centella asiatica*: phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochem Rev* 2018; 17: 161–194.
52. Witkowska K, Paczkowska-Walendowska M, Garbiec E, *et al.* Topical Application of *Centella asiatica* in Wound Healing: Recent Insights into Mechanisms and Clinical Efficacy. *Pharmaceutics* 2024; 16: 1252.
53. Park KS. Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 1–8.
54. Widiyana AP. Validasi dari Spektrofotometri UV-Vis dan Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Etanol dari Akar Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dan *Centella asiatica* (*Centella asiatica*). *J Pharm Care Anwar Med J-PhAM* 2021; 3: 126–136.
55. Cardozo MF, Bhat V, Nayak R. Formulation And Evaluation Of Cream Containing *Calendula Officinalis* And *Centella Asiatica* Aqueous Extracts. *J Biol Sci Opin* 2022; 10: 85–88.
56. Sukirawati S, Khouw HS. Uji Aktivitas Antibakteri Krim Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap *Propionibacterium acne*. *J Kesehat Yamasi Makassar* 2023; 7: 74–80.
57. Ramdan SRK, Purwanti D, Kurniasih N, *et al.* Formulation And Spf Value Sunscreen Cream Combination Gotu Kola Extract (*Centella asiatica* L). 8.
58. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, *et al.* *Centella asiatica* in cosmetology. *Adv Dermatol Allergol* 2013; 1: 46–49.
59. Mariana Isir, Vera Iriani Abdullah. Testing The Effectiveness of The Pregnancy of *Centella asiatica* Leaf Extract Gel Formula 10% for Striae Gravidarum Management in Pregnant Women. *EMBRIO* 2021; 13: 125–133.
60. Deshpande P, Mohan V, Thakurdesai P. Preclinical safety assessment of standardized extract of *Centella asiatica* (L.) urban leaves. *Toxicol Int* 2015; 22: 10.
61. Shoji H, Miyakawa T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep* 2019; 39: 100–118.
62. Mutiarahmi CN, Hartady T, Lesmana R. Use Of Mice As Experimental Animals In Laboratories That Refer To The Principles Of Animal Welfare: A Literature Review. *Indones Med Veterinus* 2021; 10: 134–145.

63. Immunohistochemistry Procedure,
<https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/protocol/protein-biology/immunohistochemistry/immunohistochemistry-protocol?> (accessed 26 November 2024).
64. Sari, N., Samsul, E. & Narsa, A. C. Pengaruh Trietanolamin pada Basis Krim Minyak dalam Air yang Berbahan Dasar Asam Stearat dan Setil Alkohol. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences* **14**, 70–75 (2021).
65. 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 Oct 12;12(20):3547.
66. CU ON, FU I, J A, OJ P, PH W. Nutrient and Phytochemical Composition of *Centella asiatica* Leaves. *Med Aromat Plants (Los Angel)*. 2020;9(2).
67. Yang L, Marney L, Magana AA, Choi J, Wright K, Mcferrin J, *et al.* Quantification of caffeoylquinic acids and triterpenes as targeted bioactive compounds of *Centella asiatica* in extracts and formulations by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography Open*. 2023 Nov;4:100091.
68. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA Statement on *p* -Values: Context, Process, and Purpose. *Am Stat*. 2016 Apr 2;70(2):129–33.
69. Yadav E. *Niacinamide* and Coenzyme Q10: Molecular Insights into Skin Health, Longevity, and Optimized Cosmetic Formulations. *Advance Research in Dermatology & Cosmetics (ARDC)*. 2023 Apr 18;2(1):1–2.
70. Linda Yulianti Wijayadi, Mardliyati E, Bramono K, Freisleben HJ. Asiaticoside induces cell proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Univ Med*. 2015;34(2):96–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.18051/UnivMed.2015.v34.96-103>
71. García M, Llames S, García E, Meana A, Cuadrado N, Recasens M, *et al.* *In vivo* Assessment of Acute UVB Responses in Normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) Skin-Humanized Mouse Models. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):865–72.
72. Gyöngyösi N, Lőrincz K, Keszeg A, Haluszka D, Bánvölgyi A, Tátrai E, *et al.* Photosensitivity of murine skin greatly depends on the genetic background: clinically relevant dose as a new measure to replace minimal erythema dose in mouse studies. *Exp Dermatol*. 2016 Jul 20;25(7):519–25.
73. Kulikov D, Makmatov-Rys M, Raznitsyna I, Glazkova P, Gerzhik A, Glazkov A, *et al.* Methods of Non-Invasive *In vivo* Optical Diagnostics in the

- Assessment of Structural Changes in the Skin Induced by Ultraviolet Exposure in an Experimental Model. *Diagnostics*. 2021 Aug 12;11(8):1464.
74. Altman AM, Bankson J, Matthias N, Vykoukal J V., Song YH, Alt EU. Magnetic resonance imaging as a novel method of characterization of cutaneous *photoaging* in a murine model. *Arch Dermatol Res*. 2008 Jun 28;300(5):263–7.
 75. O’Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, *et al.* Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol*. 2014 Jun 21;8(4):783–98.
 76. Bissett DL, Oblong JE, Berge CA. *Niacinamide*. *Dermatologic Surgery*. 2005 Jul;31(s1):860–6.
 77. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013;30(1):46–9.
 78. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Solar Ultraviolet Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor- β Type II Receptor/Smad Signaling. *Am J Pathol*. 2004 Sep;165(3):741–51.
 79. Incandela, L., Cesarone, M. R., Cacchio, M., De Sanctis, M. T., Santavenere, C., D'Auro, M. G., Bucci, M., & Belcaro, G. (2001). Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in chronic venous insufficiency and in high-perfusion microangiopathy. *Angiology*, 52 Suppl 2, S9–S13.
 80. Quan, Taihao, Tianyuan He, Sewon Kang, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher. 2004. “Solar Ultraviolet Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor- β Type II Receptor/Smad Signaling.” *The American Journal of Pathology* 165 (3): 741–51. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63337-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63337-8).
 81. Varghese, Frency, Amirali B. Bukhari, Renu Malhotra, and Abhijit De. 2014. “IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples.” *PLoS ONE* 9 (5): e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>.
 82. Jensen, Ellen C. 2013. “Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ.” *The Anatomical Record* 296 (3): 378–81. <https://doi.org/10.1002/ar.22641>.
 83. Agathokleous, Evgenios, and Edward J. Calabrese. 2019. “Hormesis: The Dose Response for the 21st Century: The Future Has Arrived.” *Toxicology* 425 (September): 152249. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152249>.

84. Rittie, L., and G. J. Fisher. 2015. "Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (1): a015370–a015370. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015370>.
85. National Research Council. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
86. Nastiti, Christofori, Thellie Ponto, Eman Abd, Jeffrey Grice, Heather Benson, and Michael Roberts. 2017. "Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery." *Pharmaceutics* 9 (4): 37. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037>.

