

**PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*CENTELLA ASIATICA*) TERHADAP KADAR IL-1
DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE III
(Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang dipapar sinar UVB)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Novi Andritia

NIM : MBK2322010389

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

TESIS

**PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(*CENTELLA ASIATICA*) TERHADAP KADAR IL-1
DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE III
(Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang dipapar sinar UVB)**

Disusun oleh:

Novi Andritia

MBK2322010389

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada Tanggal 5 November 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima.

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. dr. Pasid Harlisa, Sp.D.V.E., FINSADV., FAADV
NIK. 8951110021


Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF
NIK. 219199049

Mengetahui

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




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

PERNYATAAN

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

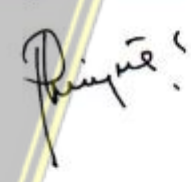


LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis Dengan Judul "PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*CENTELLA ASIATICA*) TERHADAP KADAR IL-1 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE III (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang dipapar sinar UVB)" ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada :

Hari : Rabu

Tanggal: 5 November 2023

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

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Novi Andritia
Tempat / tanggal lahir : Banjarnegara, 8 November 1990
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK PGRI : Lulus tahun 1995
2. SD N 1 Krandegan : Lulus tahun 2003
3. SMP N 1 Banjarnegara : Lulus tahun 2006
4. SMA N 1 Bawang : Lulus tahun 2009
5. S1 Fakultas Kedokteran UGM : Lulus tahun 2014
6. Profesi Dokter UGM : Lulus tahun 2016
7. Magister Ilmu Bomedik FK Unissula : (2023 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

Nama Suami : Yanuar Dody Gusniar
Nama Anak : Kira Athafariz Gusniar
Kelana Pangeran Nawasena Gusniar

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH KRIM EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*CENTELLA ASIATICA*) TERHADAP KADAR IL-1 DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE III (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang dipapar sinar UVB)**. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Dr. dr. Pasid Harlisa, Sp.D.V.E, FINSADV, FAADV selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Prof. Dr. Dra. Atina Hussana, M. Si. Apt selaku penguji I, yang telah memberi masukan, mendukung serta mengarahkan penulis sehingga penulis termotivasi untuk menyelesaikan thesis ini dengan baik.
7. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE, Subsp.D.K.E, FINSADV, FAADV selaku penguji II, yang telah memberi masukan, mendukung serta mengarahkan penulis sehingga penulis termotivasi untuk menyelesaikan thesis ini dengan baik
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji III, yang telah memberi masukan, mendukung serta mengarahkan penulis sehingga penulis termotivasi untuk menyelesaikan thesis ini dengan baik.
9. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya

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

Semarang, 5 November 2025
Penulis,

Novi Andritia
MBK2322010389



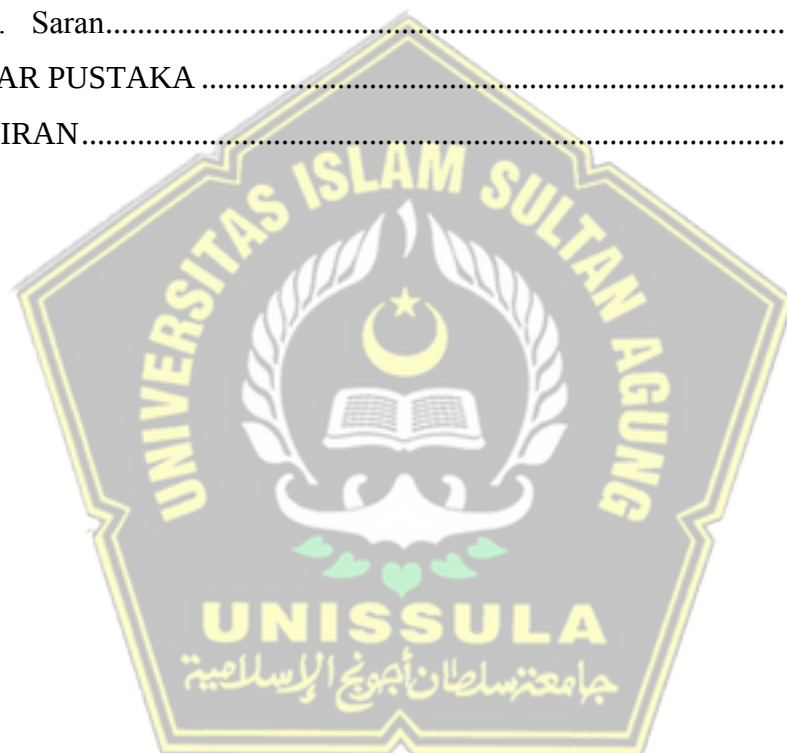
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
ABSTRAK	xix
ABSTRACT.....	xx
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Utama.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Interleukin 1 (IL-1)	10
2.1.1. Definisi.....	10
2.1.2. Peran IL-1 pada <i>photoaging</i> akibat UVB.....	11
2.2. Kolagen Tipe III (Col3).....	13
2.2.1. Macam-Macam Kolagen.....	13

2.2.2.	Definisi Kolagen Tipe III	15
2.2.3.	Peran Kolagen Tipe III dalam struktur kulit dan <i>photoaging</i>	15
2.3.	Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	18
2.3.1.	Definisi Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	18
2.3.2.	Komponen bioaktif dalam <i>Centella asiatica</i> dan mekanisme anti-inflamasi.....	19
2.3.3.	Efek Ekstrak <i>Centella asiatica</i> dalam mencegah kerusakan kulit akibat UVB	24
2.4.	Ultraviolet B (UVB).....	26
2.4.1.	Definisi UVB dan perannya dalam <i>photoaging</i> dan kerusakan ECM	26
2.5.	Sediaan Topikal	30
2.5.1.	Definisi sediaan topikal.....	30
2.5.2.	Sediaan krim	31
2.6.	Pengaruh Krim Ekstrak <i>Centella asiatica</i> terhadap Kadar IL-1 dan Ekspresi Kolagen Tipe III pada Tikus yang Dipapar UVB.....	34
2.6.1.	Peran krim <i>Centella asiatica</i> dalam modulasi respon inflamasi dan pencegahan degradasi kolagen	34
2.6.2.	Mekanisme proteksi krim <i>Centella asiatica</i> terhadap kerusakan kulit akibat UVB.....	36
2.7.	Pengaruh Krim <i>Niacinamide</i> terhadap Kadar IL-1 dan Ekspresi Kolagen Tipe III pada Tikus yang Dipapar UVB.....	37
2.7.1.	Peran krim <i>Niacinamide</i> dalam modulasi respon inflamasi dan pencegahan degradasi kolagen.....	37
2.7.2.	Mekanisme proteksi krim <i>Niacinamide</i> terhadap kerusakan kulit akibat UVB	39
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....		41
3.1.	Kerangka Teori.....	41
3.2.	Kerangka Konsep	45
3.3.	Hipotesis.....	45

BAB IV METODE PENELITIAN	46
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	46
4.2. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	47
4.2.1. Subyek Penelitian.....	47
4.2.2. Sampel Penelitian.....	47
4.2.3. Kriteria Inklusi dan <i>Drop Out</i>	48
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Penelitian	48
4.3.1. Variabel Penelitian	48
4.3.2. Definisi Operasional.....	49
4.4. Bahan dan Alat Penelitian	52
4.4.1. Alat.....	52
4.4.2. Bahan	53
4.5. Cara Penelitian dan Alur Penelitian	53
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	53
4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	54
4.5.3. Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	54
4.5.4. Penetapan Dosis	56
4.5.5. Penyinaran UVB dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	56
4.6. Alur Penelitian	58
4.7. Teknik Pengumpulan Sampel.....	59
4.7.1. Cara pengambilan Sampel Penelitian.....	59
4.7.2. Besar Sampel.....	59
4.7.3. Pengambilan Sampel Jaringan	60
4.7.4. Analisis Kadar IL-1 menggunakan ELISA	60
4.7.5. Analisis Ekspresi Kolagen Tipe III Menggunakan IHC dan ImageJ	61
4.8. Metode Analisis Data	63
4.9. Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	64
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	65
5.1. Hasil Penelitian	65

5.1.1. Evaluasi Makroskopis Kulit Punggung Tikus.....	65
5.1.2. Hasil analisis kadar IL-1 jaringan kulit pada tiap kelompok	66
5.1.3. Hasil analisis ekspresi COL3 jaringan kulit pada tiap kelompok.....	70
5.2. Pembahasan.....	74
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	78
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	81
6.1. Kesimpulan	81
6.2. Saran.....	81
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN.....	96



DAFTAR SINGKATAN

AHA	: <i>Alpha Hydroxy Acid</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
AR	: <i>Agastache rugosa</i>
Bcl2	: <i>B-cell Lymphoma 2</i>
Bcl-xl	: <i>B-cell Lymphoma-extra Large</i>
BHA	: <i>Beta Hydroxy Acid</i>
CIRP	: <i>Cold-Inducible RNA-Binding Protein</i>
Col1	: <i>Kolagen Tipe I</i>
Col3	: <i>Kolagen Tipe III</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
HDF	: <i>Human Dermal Fibroblasts</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MMP-1	: <i>Matrix Metalloproteinase-1</i>
MMP-3	: <i>Matrix Metalloproteinase-3</i>
MMP-9	: <i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
NETs	: <i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor-kappa Beta</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O/W	: <i>Oil-in-Water</i>
p38 MAPK	: <i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PCNA	: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SB431542	: <i>Specific Inhibitor of TGF-β Type I Receptor Kinase</i>

Smad	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UV	: Ultraviolet
UVB	: Ultraviolet B
W/O	: <i>Water-in-Oil</i>



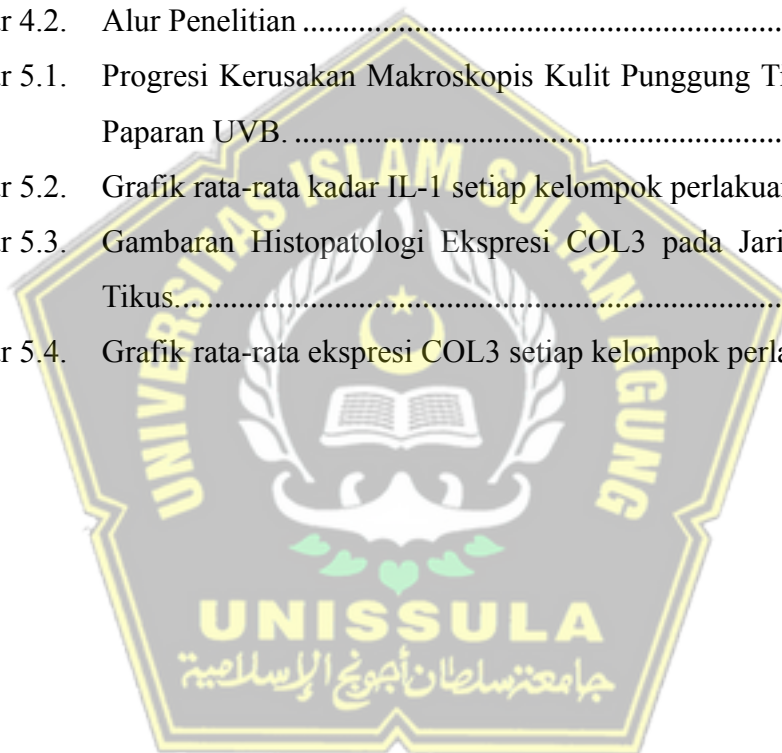
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 2.1. Profil Fitokimiawi ekstrak <i>Centella asiatica</i>	24
Tabel 4.1. Formula Basis Krim	55
Tabel 5.1. Hasil analisis statistik rerata kadar IL-1	67
Tabel 5.2. Hasil analisis statistik rerata ekspresi COL3.....	72



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	19
Gambar 2.2.	Struktur Kimia <i>Madecassoside</i> (atas) dan <i>Asiaticoside</i> (bawah)..	20
Gambar 2.3.	Struktur Kimia <i>Asiatic Acid</i> (kiri) dan <i>Madecassic Acid</i> (kanan).	20
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	44
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep.....	45
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian.....	47
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	58
Gambar 5.1.	Progresi Kerusakan Makroskopis Kulit Punggung Tikus Akibat Paparan UVB.	66
Gambar 5.2.	Grafik rata-rata kadar IL-1 setiap kelompok perlakuan.....	69
Gambar 5.3.	Gambaran Histopatologi Ekspresi COL3 pada Jaringan Kulit Tikus.....	71
Gambar 5.4.	Grafik rata-rata ekspresi COL3 setiap kelompok perlakuan.....	74



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Izin Etik Penelitian	96
Lampiran 2.	Keterangan Hasil Penelitian Dari Lab IBL & UNS	97
Lampiran 3.	Dokumentasi Penelitian	102
Lampiran 4.	Dokumentasi Hasil Mikroskopis Imunohistokimia (COL3).....	113
Lampiran 5.	Lampiran hasil statistik yang diolah menggunakan software Graphpad Prism 10.3.0.....	118





ABSTRAK

Latar Belakang: UVB menginduksi photoaging melalui peningkatan IL-1 dan perubahan COL3. *Centella asiatica* (CA) menunjukkan efek anti-inflamasi dan modulasi kolagen, namun perbandingan langsung dengan Niacinamide pada model UVB masih kurang.

Tujuan: Mengevaluasi krim CA 5% dan 10% terhadap kadar IL-1 dan ekspresi COL3 pada kulit tikus Wistar yang dipapar UVB.

Metode: Studi terkontrol in vivo post-test-only. Dua puluh lima tikus Wistar jantan (n=5/kelompok): K1 (sehat), K2 (vehikulum+UVB), K3 (Niacinamide 5%+UVB), K4 (CA 5%+UVB), K5 (CA 10%+UVB). Paparan UVB (14 hari) diikuti perlakuan topikal (14 hari). IL-1 diukur dengan ELISA; COL3 dengan IHC.

Hasil: IL-1 secara signifikan lebih tinggi pada K2 (86,40 pg/ml) dibanding K1 ($p<0,0001$). K4 (33,65 pg/ml) dan K3 (37,35 pg/ml) secara signifikan lebih rendah dari K2 ($p<0,0001$); K4 vs K3 tidak berbeda ($p=0,9900$). K5 (68,21 pg/ml) tidak lebih rendah secara signifikan dari K2. Ekspresi COL3 lebih tinggi pada K2 dibanding K1; K3–K5 tidak menunjukkan perbedaan signifikan dari K2 ($p=0,4568$) namun menunjukkan tren menuju nilai K1.

Kesimpulan: Krim CA 5% memiliki kadar IL-1 yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok krim vehikulum + UVB, setara dengan hasil kelompok Niacinamide 5%, yang mengonfirmasi aksi anti-inflamasi pada photoaging akibat UVB.

Kata Kunci: *Centella asiatica*, IL-1, COL3, UVB, photoaging, krim, tikus Wistar, ECM, ELISA, IHC

ABSTRACT

Background: UVB induces photoaging via elevated IL-1 and altered COL3. *Centella asiatica* (CA) shows anti-inflammatory and collagen-modulatory effects, yet direct comparison with Niacinamide in UVB models is lacking.

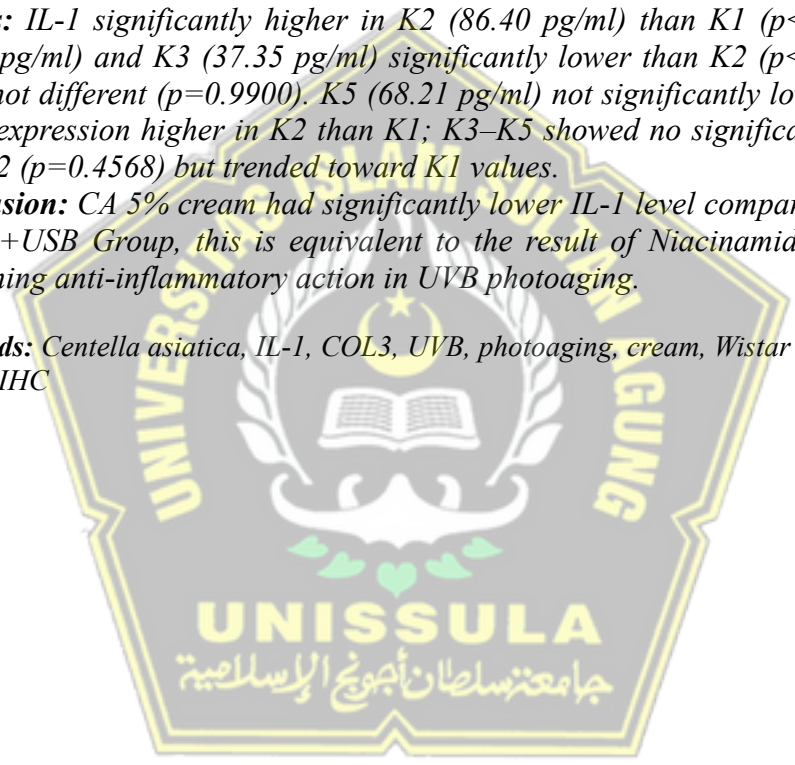
Objectives: To assess 5% and 10% CA creams on IL-1 levels and COL3 expression in UVB-exposed Wistar rat skin.

Methodology: In vivo post-test-only controlled study. Twenty-five male Wistar rats ($n=5/\text{group}$): K1 (healthy), K2 (vehicle+UVB), K3 (Niacinamide 5%+UVB), K4 (CA 5%+UVB), K5 (CA 10%+UVB). UVB exposure (14 days) followed by topical treatment (14 days). IL-1 measured by ELISA; COL3 by IHC.

Results: IL-1 significantly higher in K2 (86.40 pg/ml) than K1 ($p<0.0001$). K4 (33.65 pg/ml) and K3 (37.35 pg/ml) significantly lower than K2 ($p<0.0001$); K4 vs K3 not different ($p=0.9900$). K5 (68.21 pg/ml) not significantly lower than K2. COL3 expression higher in K2 than K1; K3–K5 showed no significant difference from K2 ($p=0.4568$) but trended toward K1 values.

Conclusion: CA 5% cream had significantly lower IL-1 level compared to vehicle cream +UVB Group, this is equivalent to the result of Niacinamide 5% group, confirming anti-inflammatory action in UVB photoaging.

Keywords: *Centella asiatica*, IL-1, COL3, UVB, photoaging, cream, Wistar rats, ECM, ELISA, IHC



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Berbagai penelitian telah mengungkap potensi *Centella asiatica* sebagai agen antiinflamasi dan stimulator sintesis kolagen. Namun, hingga saat ini, evaluasi efektivitasnya dalam melindungi kulit dari proses *photoaging* akibat paparan sinar UVB melalui pendekatan terpadu yang menggabungkan analisis molekuler (kadar IL-1) dengan konfirmasi histopatologis (ekspresi kolagen tipe III) masih belum banyak dieksplorasi. Terlebih lagi, literatur yang ada belum menyajikan perbandingan langsung antara *Centella asiatica* dan *Niacinamide*, salah satu agen antiaging topikal yang telah mendapat validasi klinis luas, dalam konteks proteksi kulit terhadap sinar UVB¹⁻⁵. Kesenjangan inilah yang menjadi landasan rasional penelitian ini, dengan tujuan untuk mengonfirmasi mekanisme kerja *Centella asiatica* sekaligus memposisikan potensinya secara objektif terhadap standar terapi yang sudah mapan.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah memberikan landasan penting mengenai aktivitas antiinflamasi *Centella asiatica*, meskipun seringkali dalam konteks patogenik yang berbeda dari *photoaging*. Sebagai contoh, studi pada model dermatitis atopik (Lee *et al.*, 2020) dan psoriasis (Lin *et al.*, 2023) telah menunjukkan kemampuan *Centella asiatica* dalam memodulasi jalur inflamasi seperti NF- κ B/MAPK dan JAK/STAT3^{1,2}. Walaupun temuan ini sangat berharga, model penyakit tersebut tidak secara

langsung menggambarkan mekanisme utama *photoaging* yang dipicu oleh UVB, seperti aktivasi *matrix metalloproteinases* (MMP) dan degradasi kolagen. Penelitian kami bertujuan melengkapi temuan ini dengan mengaplikasikannya pada model yang secara spesifik dirancang untuk merefleksikan penuaan kulit akibat radiasi ultraviolet.

Lebih lanjut, eksplorasi mekanisme *Centella asiatica* juga telah dilakukan pada level seluler dan pada organ selain kulit. Studi *in vitro* oleh Wijayadi *et al.* (2015) secara fundamental menunjukkan bahwa asiaticoside dapat merangsang sintesis kolagen pada kultur fibroblas⁵. Di sisi lain, studi *in vivo* oleh Choi *et al.* (2016) melaporkan potensi antiinflamasi dan antioksidan pada jaringan liver³. Penelitian kami dirancang sebagai langkah penerapan untuk mengonfirmasi cara kerja mekanisme tersebut dalam sebuah sistem kulit yang utuh dan hidup (*in vivo*) di bawah tekanan paparan UVB sub-akut, sehingga menjembatani temuan tingkat seluler dengan respons fisiologis pada organ target.

Bahkan di antara studi yang telah menggunakan model kulit *in vivo*, seperti yang dilakukan oleh Venesia *et al.* (2020) mengenai uji efektivitas ekstrak *Centella asiatica* terhadap perbaikan kolagen dan hidrasi kulit tikus, masih terdapat ruang untuk pengembangan metodologi yang lebih komprehensif⁴. Penelitian tersebut memberikan data mengenai respons di berbagai tingkat dosis yang bermanfaat, namun desainnya belum menyertakan model kerusakan akibat paparan UVB maupun kontrol positif tervalidasi seperti *Niacinamide*. Oleh karena itu, penelitian kami secara

khusus dirancang untuk membangun di atas fondasi ini dengan mengintegrasikan model UVB terstandar dan perbandingan langsung dengan *Niacinamide* 5% sebagai standar pembanding untuk evaluasi yang lebih objektif.

Dengan demikian, penelitian ini mengusung pendekatan inovatif melalui integrasi tiga aspek utama. Pertama, penggunaan model in vivo dengan paparan sinar UVB sub-akut (312 nm, 2 MED, 14 hari) untuk menginduksi tanda-tanda awal *photoaging*. Kedua, penerapan analisis komprehensif yang mencakup parameter molekuler (interleukin-1), evaluasi histologis (kolagen tipe III), serta perbandingan terhadap *Niacinamide* 5% sebagai kontrol positif. Ketiga, fokus pada kegunaan praktis untuk pengembangan produk perawatan kulit di wilayah tropis. Melalui desain ini, penelitian diharapkan dapat mengisi kesenjangan pemahaman ilmiah sekaligus menghasilkan data yang bersifat aplikatif yang dapat dijadikan acuan oleh industri kosmetik untuk mengembangkan formulasi *anti-photoaging* yang lebih aman, efektif, dan terjangkau.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut di atas, maka rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah: Apakah terdapat pengaruh krim ekstrak *Centella asiatica* terhadap ekspresi kolagen tipe III dan kadar IL-1 pada tikus wistar yang terpapar UV-B?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Utama

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh krim ekstrak *Centella asiatica* terhadap Ekspresi kolagen tipe III dan kadar IL-1 pada tikus wistar yang terpapar UV-B.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengukur kadar Interleukin-1 pada aplikasi *Centella asiatica* dengan konsentrasi 5% dan 10% pada kulit tikus wistar dibandingkan dengan kontrol.
2. Mengukur ekspresi kolagen tipe III pada aplikasi *Centella asiatica* dengan konsentrasi 5% dan 10% pada kulit tikus wistar dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Secara teoritis manfaat yang diberikan penelitian ini adalah memberikan kontribusi pada pemahaman yang mendasari kerusakan kulit akibat radiasi UVB dan peran *Centella asiatica* dalam melindungi kulit. Menambah pengetahuan tentang efek *Centella asiatica* pada regulasi kolagen dan interleukin dalam konteks kerusakan kulit akibat UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Secara praktis manfaat dari penelitian ini yaitu dapat menyediakan bukti ilmiah untuk mendukung penggunaan *Centella asiatica* sebagai bahan aktif dalam produk perawatan kulit atau terapi untuk mencegah penuaan dini dan kerusakan kulit akibat paparan sinar matahari. Memberikan dasar untuk pengembangan strategi pencegahan dan pengobatan yang lebih efektif untuk mengatasi kerusakan kulit akibat UVB.



1.5. Originalitas Penelitian.

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
Lee, Y., Choi, H.K., N'deh, K.P.U., Choi, Y.-J., Fan, M., Kim, E., Chung, K.-H. & An, J.H. ¹ (2020)	<i>Inhibitory Effect of Centella asiatica Extract on DNCB-Induced Atopic Dermatitis in HaCaT Cells and BALB/c Mice</i>	<i>in vivo</i>	Ekstrak <i>Centella asiatica</i> mengurangi ekspresi sitokin inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α
Lin P, Shi HY, Lu YY, & Lin J ² (2023)	<i>Centella asiatica alleviates psoriasis through JAK/STAT3-mediated inflammation: An in vitro and in vivo study.</i>	<i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i>	Ekstrak <i>Centella asiatica</i> menurunkan kadar mRNA faktor inflamasi (IFN- γ , CCL20, IL-6 dan TNF- α)
Choi MJ, Zheng HM, Kim JM, Lee KW, Park YH, & Lee DH. ³ (2016)	<i>Protective effects of Centella asiatica leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats</i>	<i>in vivo</i>	<i>Centella asiatica</i> menurunkan kadar mediator inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α , dan lainnya
Linda Yulianti Wijayadi, Mardliyati E, Bramono K, Freisleben HJ. ⁵ (2015)	<i>Asiaticoside induces cell proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts</i>	<i>in vitro</i>	Asiaticoside menginduksi proliferasi HDF dan sintesis kolagen tipe I dan III.
Nikko Fernando Venesia, Edy Fachrial, I. Nyoman Ehrich Lister ⁴	<i>Effectiveness Test of Centella asiatica Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (Rattus Norwegicus Wistar)</i>	<i>In vivo</i>	<i>Centella asiatica</i> meningkatkan ekspresi kolagen dan hidrasi kulit pada tikus wistar
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>	<i>In vivo</i>	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

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
			< 0,05). Efeknya tergantung pada dosis. Menjadi salah satu acuan dosis dalam penelitian kami
Ratz-Lyko A, <i>et al.</i>	<i>Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing Centella asiatica Extract</i>	<i>In vivo</i>	Formulasi kosmetik dengan ekstrak <i>Centella asiatica</i> 5% menunjukkan efek pelembab (moisturizing) dan anti-inflamasi yang signifikan pada kulit manusia. Menjadi salah satu acuan dosis dalam penelitian kami

Penelitian-penelitian yang dirangkum dalam tabel di atas memberikan landasan ilmiah yang kuat bagi studi ini, sekaligus menyoroti kebaruan dan signifikansi dari pendekatan yang akan dilakukan. Secara garis besar, penelitian terdahulu telah mengonfirmasi potensi *Centella asiatica* dalam dua domain utama yang relevan yaitu sebagai agen anti-inflamasi dan sebagai stimulator sintesis kolagen.

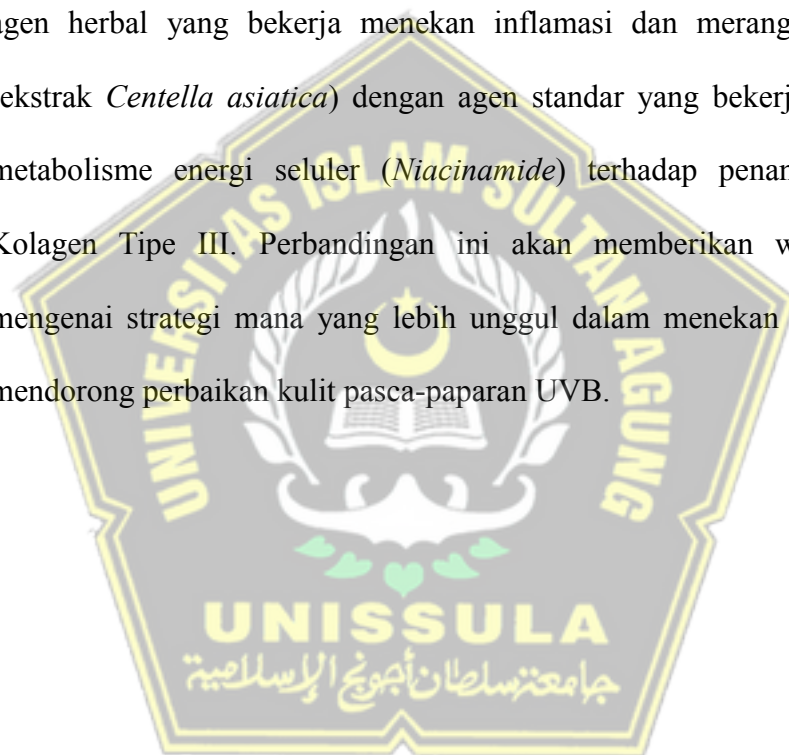
Domain pertama, yaitu peran anti-inflamasi, telah mapan melalui berbagai studi. Penelitian oleh Lee, *et al.* (2020), Lin P, *et al.* (2023), dan terutama Choi MJ, *et al.* (2016), secara konsisten menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mampu menekan ekspresi berbagai sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-6, TNF- α , dan secara spesifik IL-1 β . Peran penelitian-penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa *Centella asiatica* memiliki mekanisme anti-inflamasi yang kuat. Namun, perbedaannya

adalah, studi-studi tersebut dilakukan dalam konteks patologis yang berbeda (dermatitis atopik, psoriasis, cedera hati). Penelitian ini akan menjadi yang pertama mengukur ekspresi IL-1 secara spesifik sebagai penanda kunci inflamasi dalam model *photoaging* yang diinduksi oleh paparan UVB.

Domain kedua adalah peran *Centella asiatica* dalam perbaikan matriks kulit. Penelitian oleh Linda Yulianti Wijayadi, *et al.* (2015) secara *in vitro* menjadi landasan yang sangat penting karena secara eksplisit membuktikan bahwa komponen aktif asiaticoside dapat merangsang sintesis Kolagen Tipe III. Temuan ini kemudian didukung secara *in vivo* oleh Nikko Fernando Venesia, *et al.*, yang menunjukkan adanya peningkatan kolagen secara umum pada kulit tikus. Peran kedua studi ini adalah mengonfirmasi efek restoratif dari *Centella asiatica*. Perbedaannya, penelitian ini akan secara spesifik mengkuantifikasi ekspresi Kolagen Tipe III secara *in vivo* pada kulit yang mengalami *photoaging* akibat paparan UVB, untuk melihat potensi perbaikan strukturalnya secara langsung dalam model kerusakan yang relevan.

Landasan justifikasi dosis untuk penelitian ini didukung kuat oleh dua studi kunci. Penelitian oleh Ratz-Lyko A, *et al.* (2016) mengonfirmasi penggunaan dosis 5% dalam formulasi kosmetik pada manusia, yang terbukti efektif memberikan efek anti-inflamasi. Sementara itu, penelitian oleh Yeny D. Rahmawati *et al.* menjadi acuan relevan untuk penggunaan dosis 10% dalam model hewan yang dipapar UVB.

Dengan demikian, orisinalitas penelitian ini terletak pada beberapa poin fundamental yaitu penelitian ini secara spesifik dan simultan mengukur IL-1 (mewakili inflamasi) dan Kolagen Tipe III (mewakili perbaikan) dalam satu model *photoaging* akibat UVB, yang belum pernah dilakukan sebelumnya. Poin kebaruan yang paling signifikan adalah desain studi ini. Belum ada penelitian yang secara langsung membandingkan efektivitas agen herbal yang bekerja menekan inflamasi dan merangsang kolagen (ekstrak *Centella asiatica*) dengan agen standar yang bekerja mendukung metabolisme energi seluler (*Niacinamide*) terhadap penanda IL-1 dan Kolagen Tipe III. Perbandingan ini akan memberikan wawasan baru mengenai strategi mana yang lebih unggul dalam menekan inflamasi dan mendorong perbaikan kulit pasca-paparan UVB.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin 1 (IL-1)

2.1.1. Definisi

Interleukin-1 (IL-1) adalah sitokin kunci yang memainkan peran sentral dalam mengatur respon imun dan inflamasi. Sitokin ini diproduksi oleh makrofag dan jenis sel lainnya, sebagai respon terhadap infeksi, cedera, atau berbagai stresor. IL-1 memberikan pengaruhnya yang kuat pada respon imun bawaan dan adaptif, yang memengaruhi berbagai aktivitas seluler dengan mengikat reseptor spesifik pada sel target.

Sitokin ini adalah bagian dari superfamili sitokin yang mencakup sebelas protein yang serupa secara struktural, yang semuanya terlibat dalam memediasi atau mengatur peradangan⁶. Sitokin ini diproduksi oleh sel yang berbeda, termasuk makrofag, leukosit, dan sel endotel. IL-1 memberikan efeknya dengan mengikat reseptor afinitas tinggi yang ada pada sel target⁷. Sitokin ini dapat menampilkan sifat pro-inflamasi dan anti-inflamasi sehingga berkontribusi pada aktivasi, diferensiasi, dan migrasi sel kekebalan tubuh. Hal ini menjadikan IL-1 faktor kunci dalam memodulasi respon kekebalan⁶.

2.1.2. Peran IL-1 pada *photoaging* akibat UVB

Jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase p38* (MAPK p38), *Nuclear Factor-kappa Beta* (NF- κ B), dan *Activator Protein-1* (AP-1) adalah pengatur kunci ekspresi IL-1. Jalur ini dapat meningkatkan ekspresi IL-1, bersama dengan sitokin pro-inflamasi lainnya, memperburuk kerusakan kulit ketika diaktifkan oleh radiasi UVB sehingga berkontribusi pada *photoaging*. Terdapat beberapa mekanisme di mana jalur ini mendorong ekspresi IL-1 dan berkontribusi pada keseluruhan proses kerusakan kulit yang diinduksi UVB.

Paparan UVB mengaktifkan jalur MAPK p38 yang mengarah pada peningkatan regulasi ekspresi IL-1. Jalur ini juga penting untuk regulasi ekspresi komponen faktor transkripsi AP-1 (c-fos), komponen kompleks faktor transkripsi AP-1. Inhibisi p38 secara signifikan mengurangi ekspresi c-fos dan IL-1 yang diinduksi UVB sehingga berperan penting dalam mempromosikan aktivasi AP-1 dan respon inflamasi⁸. Pada model tikus SKH-1, aktivasi p38 MAPK yang diinduksi UVB tidak hanya meningkatkan aktivitas AP-1 tetapi juga meningkatkan ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan kadar IL-1, yang semuanya terkait dengan peradangan dan promosi tumor kulit⁹.

Faktor Transkripsi AP-1 terdiri dari protein seperti ekspresi komponen faktor transkripsi AP-1 (c-Jun dan c-Fos), dan secara

signifikan berkontribusi pada peningkatan regulasi IL-1 dan sitokin inflamasi lainnya. Ekspresi IL-1 yang diinduksi oleh AP-1 memungkinkan perbanyakan sel tumor kulit dan degradasi kolagen. Pelemahan aktivitas AP-1 melalui ekspresi bentuk dominan-negatif c-jun tidak hanya mengurangi perkembangan karsinoma sel skuamosa yang diinduksi UVB tetapi juga menghasilkan pengurangan konsentrasi IL-1 di jaringan kulit yang terdampak ¹⁰. Aktivasi AP-1 juga menginduksi ekspresi matriks metalloproteinase (MMP) yang menurunkan kolagen dan berkontribusi pada kerusakan struktural dan peradangan yang sering dimediasi oleh IL-1 ¹¹.

Protein NF- κ B terkenal karena peran sentralnya dalam mengatur sitokin inflamasi, termasuk IL-1. Aktivasi NF- κ B oleh radiasi UVB dapat lebih meningkatkan produksi IL-1, mendorong peradangan dan berkontribusi pada proses *photoaging*. Inhibisi terhadap NF- κ B dan AP-1, telah disarankan sebagai strategi potensial untuk mengurangi *photoaging* dengan mengurangi ekspresi IL-1 dan menekan aktivitas MMP ¹¹.

Interaksi di antara kaskade pensinyalan yang disebutkan di atas khususnya MAPK p38, AP-1, dan NF- κ B, menyoroti fungsi sinergisnya dalam memfasilitasi ekspresi IL-1 dan memperburuk kerusakan kulit yang diinduksi UVB. Setiap jalur berkontribusi pada respon inflamasi dan degradasi kolagen yang sebagian besar dimediasi oleh IL-1. Memahami interaksi antara jalur ini dan

dampaknya terhadap produksi IL-1 sangat penting untuk merancang intervensi yang bertujuan untuk mengurangi efek paparan UVB dan mengurangi *photoaging*.

2.2. Kolagen Tipe III (Col3)

2.2.1. Macam-Macam Kolagen

Kolagen merupakan protein struktural utama dalam jaringan ikat yang berfungsi memberikan kekuatan serta elastisitas pada berbagai jaringan tubuh. Hingga saat ini, telah diidentifikasi setidaknya 28 jenis kolagen, namun hanya beberapa tipe yang paling umum dan memiliki peran esensial dalam tubuh manusia, di antaranya Kolagen Tipe I, II, III, IV, dan V¹².

Kolagen Tipe I merupakan jenis kolagen yang paling melimpah dalam tubuh manusia dan banyak ditemukan pada kulit, tendon, tulang, ligamen, serta kornea mata. Protein ini memiliki peran utama dalam memberikan kekuatan mekanis dan ketahanan terhadap tekanan, sehingga sangat penting dalam menjaga integritas struktural jaringan¹²⁻¹⁴.

Kolagen Tipe II terutama terdapat pada tulang rawan (kartilago), diskus intervertebralis, dan vitreous humor mata. Fungsi utama dari tipe ini adalah memberikan fleksibilitas serta daya tahan terhadap tekanan, khususnya pada jaringan yang mengalami kompresi seperti sendi. Oleh karena itu, kolagen tipe ini sangat berperan dalam kesehatan sistem muskuloskeletal, terutama dalam

mencegah degenerasi kartilago yang dapat menyebabkan osteoarthritis^{13,14}.

Kolagen Tipe III sering ditemukan bersama Kolagen Tipe I dalam jaringan ikat, terutama pada kulit, pembuluh darah, paru-paru, dan organ internal lainnya. Kolagen ini memiliki peran krusial dalam memberikan elastisitas dan mendukung struktur jaringan yang dinamis. Selain itu, Kolagen Tipe III sangat penting dalam proses penyembuhan luka serta perkembangan jaringan embrionik, di mana ia berkontribusi dalam pembentukan matriks ekstraseluler yang nantinya akan mengalami remodeling menjadi struktur yang lebih matang^{13,14}.

Kolagen Tipe IV memiliki struktur yang berbeda dari kolagen fibrilar lainnya karena tidak membentuk serat, melainkan tersusun dalam bentuk jaringan yang membentuk lapisan dasar (lamina basal) pada membran basal. Kolagen ini ditemukan pada epitelium pembuluh darah, ginjal, dan jaringan saraf. Perannya sangat penting dalam penyaringan molekuler serta mendukung sel-sel epitel, terutama dalam mempertahankan homeostasis dan fungsi barrier di berbagai jaringan tubuh^{14,15}.

Kolagen Tipe V berfungsi bersama dengan Kolagen Tipe I dan sering ditemukan pada kulit, plasenta, serta kornea mata. Selain berperan dalam pengaturan ukuran serat kolagen, tipe ini juga memiliki peran penting dalam pembentukan jaringan embrionik,

terutama dalam mendukung perkembangan jaringan ikat yang baru terbentuk. Kombinasi antara Kolagen Tipe I dan V sangat esensial dalam menentukan kualitas dan kekuatan jaringan ikat pada berbagai organ tubuh ^{13,14}.

2.2.2. Definisi Kolagen Tipe III

Kolagen Tipe III (Col3) adalah protein fibrilar yang umum ditemukan bersama Kolagen Tipe I di berbagai jaringan ikat, seperti kulit, pembuluh darah, dan organ internal. Col3 terdiri dari tiga rantai $\alpha 1(\text{III})$ yang identik, membentuk struktur triple helix yang memberikan fleksibilitas dan elastisitas pada jaringan ikat. Protein ini juga berperan penting dalam proses regenerasi jaringan, khususnya dalam pembentukan matriks awal selama penyembuhan luka ¹⁶.

2.2.3. Peran Kolagen Tipe III dalam struktur kulit dan *photoaging*

Kolagen Tipe III memainkan peran kunci dalam menjaga elastisitas dan fleksibilitas kulit, memberikan dukungan struktural yang dinamis pada jaringan ¹⁶. Selain itu, Col3 sangat penting dalam proses penyembuhan luka dengan membentuk kerangka awal untuk perbaikan jaringan. Selain menjadi komponen struktural utama pada jaringan ikat, Kolagen Tipe III juga berfungsi dalam mengatur interaksi antara sel-sel di dalam matriks ekstraseluler (ECM), memainkan peran penting dalam mengoordinasi migrasi seluler

selama proses regenerasi dan remodeling jaringan ¹⁷. Dalam konteks *photoaging*, Col3 mengalami perubahan sintesis dan degradasi, yang mengakibatkan penurunan elastisitas kulit dan munculnya tanda-tanda penuaan ¹⁸. Penurunan produksi Col3 tidak hanya memengaruhi elastisitas kulit tetapi juga mengurangi kapasitas jaringan untuk menahan stres mekanik. Hal ini dapat menyebabkan penurunan kemampuan kulit untuk pulih dari cedera mikro akibat paparan sinar UVB, mempercepat terjadinya kerusakan jaringan yang bersifat ireversibel. Penurunan rasio Col3:Col1 yang sering ditemukan pada kulit yang terpapar sinar UVB menjadi salah satu indikator utama terjadinya *photoaging* ¹⁹.

Proses degradasi Col3 dalam *photoaging* sebagian besar disebabkan oleh aktivitas matriks metalloproteinase (MMP), terutama MMP-3 (stromelysin) dan MMP-13 (kolagenase) ²⁰. MMP-3 secara langsung mendegradasi Col3, sedangkan MMP-13, meskipun memiliki afinitas tinggi terhadap Kolagen Tipe I dan II, juga turut berperan dalam degradasi Col3. Jalur pensinyalan molekuler seperti MAPK p38 dan faktor transkripsi AP-1 memainkan peran penting dalam mengatur ekspresi MMP yang terlibat dalam degradasi ECM, termasuk Col3 ²¹. Aktivasi jalur p38 memengaruhi transkripsi gen MMP melalui regulasi kompleks AP-1, yang meningkatkan aktivitas enzim degradasi. Studi terbaru menunjukkan bahwa modulasi jalur MAPK p38 dapat menjadi

pendekatan potensial untuk menekan aktivitas MMP dan mempertahankan struktur ECM. Misalnya, penggunaan inhibitor spesifik MAPK p38 telah terbukti mengurangi degradasi Col3 dalam model eksperimental, memberikan harapan untuk aplikasi klinis di masa depan²².

Selain itu, sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 merangsang fibroblas untuk memproduksi lebih banyak MMP, mempercepat pemecahan Col3¹⁶. Dalam konteks inflamasi kronis yang sering terjadi pada kulit yang terpapar sinar UVB secara berkepanjangan, aktivitas MMP yang berlebihan juga dapat memengaruhi jalur pensinyalan lain seperti NF- κ B. Jalur ini diketahui berperan dalam mempertahankan inflamasi, menciptakan umpan balik positif yang memperburuk degradasi ECM. Dalam kondisi paparan sinar UVB, peningkatan aktivitas inflamasi ini memperburuk degradasi ECM, yang pada akhirnya mengakibatkan gangguan elastisitas dan integritas kulit. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) adalah regulator utama sintesis Col3. Dalam kondisi fisiologis, TGF- β mempromosikan produksi Col3, tetapi paparannya pada sinar UVB dapat mengubah keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen, dengan cenderung meningkatkan aktivitas MMP²³. Interaksi kompleks ini mengurangi elastisitas kulit dan mempercepat penuaan. Pemahaman mendalam tentang mekanisme molekuler yang mengatur degradasi Col3 dalam

photoaging, termasuk peran MMP, jalur pensinyalan MAPK, dan modulasi oleh TGF- β , membuka peluang untuk mengembangkan strategi terapeutik baru ²³. Pendekatan yang menargetkan jalur ini dapat membantu memperlambat proses penuaan kulit dan meningkatkan elastisitas jaringan. Selain intervensi farmakologis, pendekatan berbasis nutrisi dan penggunaan senyawa bioaktif seperti antioksidan dari bahan alami juga mulai dieksplorasi sebagai strategi untuk memperlambat degradasi ECM. Kombinasi terapi yang menargetkan jalur inflamasi, produksi MMP, dan sintesis kolagen dapat memberikan hasil yang lebih optimal dalam pengelolaan *photoaging* ²⁴.

2.3. Ekstrak *Centella asiatica*

2.3.1. Definisi Ekstrak *Centella asiatica*

Centella asiatica yang juga dikenal sebagai pegagan telah digunakan dalam pengobatan tradisional selama berabad-abad dan dipandang berorientasi ilmiah ²⁵. Tanaman ini telah digunakan di negara-negara Asia Tenggara, India, China, dan pulau-pulau di Indonesia karena manfaatnya ^{26–29}. Tanaman herbal ini juga telah disebutkan dalam literatur tradisional di seluruh dunia mampu mengobati masalah kulit, penyembuhan luka, merevitalisasi saraf dan sebagai suplemen otak ²⁹. Tanaman ini telah digunakan untuk pengobatan luka kecil, luka bakar, psoriasis, skleroderma,

photoaging, selulit dan striae^{25,27,30}. Secara taksonomi tanaman ini termasuk dalam :

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Tracheophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Apiales
- Suku : Apiaceae
- Marga : Centella
- Spesies : *Centella asiatica* (L.) Urb.

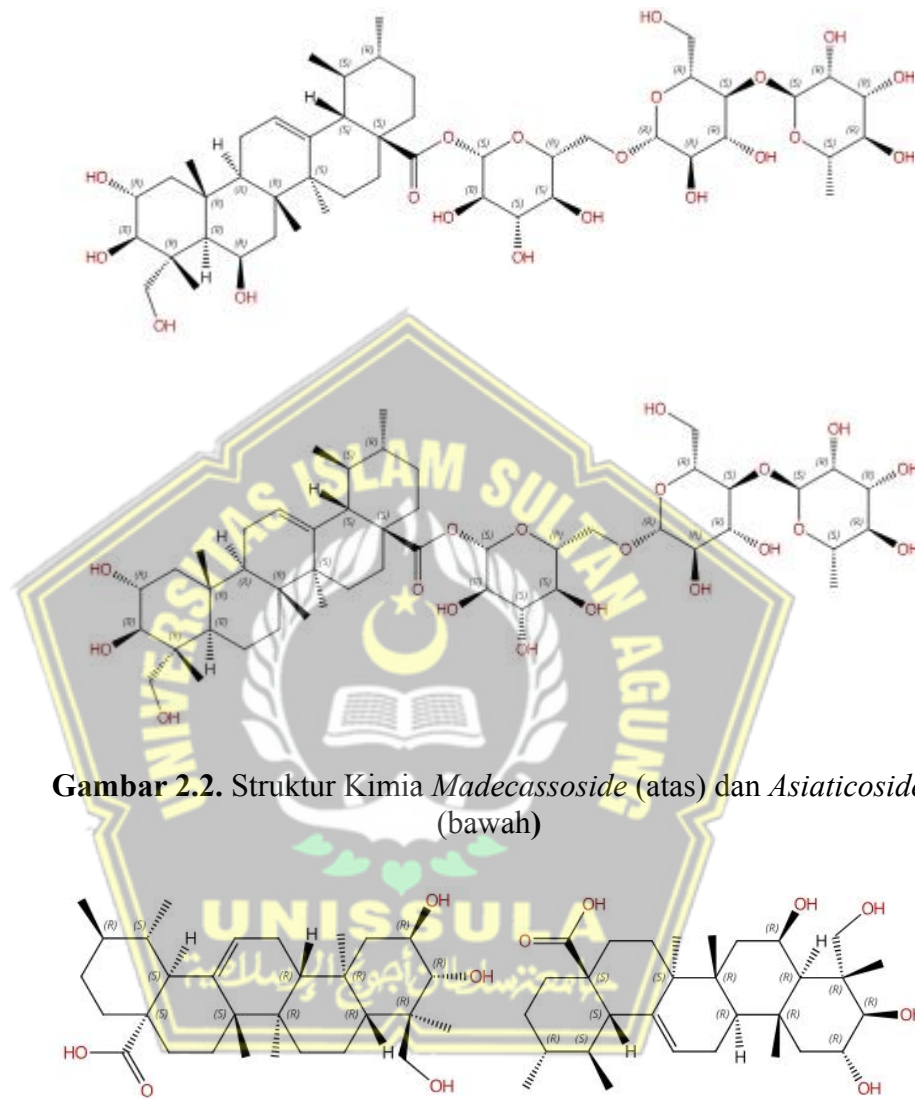


Gambar 2.1. Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

2.3.2. Komponen bioaktif dalam *Centella asiatica* dan mekanisme anti-inflamasi

Centella asiatica adalah tanaman herbal yang terkenal karena komposisi senyawa bioaktifnya yang kaya. Profil fitokimia *Centella asiatica* sangat beragam, mencakup triterpen, flavonoid, terpenoid, dan minyak volatil^{31,32}. Di antara senyawa-senyawa ini, triterpen asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid, dan madecassoside sangat menonjol karena aktivitas biologisnya yang kuat^{33,34}. Fraksi triterpenoid dari *Centella asiatica* menyumbang sekitar 45% dari

berat ekstrak dan telah terbukti memiliki potensi dalam produk yang mempromosikan pertumbuhan rambut ³⁵.



Gambar 2.2. Struktur Kimia *Madecassoside* (atas) dan *Asiaticoside* (bawah)

Gambar 2.3. Struktur Kimia *Asiatic Acid* (kiri) dan *Madecassic Acid* (kanan)

Senyawa bioaktif dalam *Centella asiatica*, asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, dan madecassic acid, memiliki karakteristik struktural yang khas yang memungkinkan mekanisme mereka dalam pencegahan *photoaging*. Senyawa-senyawa ini

memiliki struktur inti triterpene pentasiklik yang sama namun berbeda dalam gugus fungsional dan susunannya, yang menghasilkan tingkat efektivitas yang berbeda dalam melindungi kulit dari kerusakan akibat paparan UV ³⁶⁻³⁹.

Asiaticoside dan madecassoside adalah senyawa glikosidik yang dicirikan oleh dua komponen struktural. Kedua molekul ini mengandung inti triterpene di sisi kanan dan gugus glikosida di sisi kiri. Inti triterpene memberikan stabilitas molekuler melalui struktur cincin sikliknya dan mengandung gugus hidroksil (OH) yang berperan sebagai donor hidrogen dalam aktivitas antioksidan ^{37,40}. Bagian glikosida, yang terdiri dari rantai oligosakarida, meningkatkan kelarutan dalam air dan bioavailabilitas (tingkat penyerapan zat aktif ke dalam jaringan) seluler ⁴⁰. Meskipun mirip, madecassoside memiliki gugus hidroksil tambahan pada bagian aglycon-nya, menghasilkan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan asiaticoside ⁴⁰.

Sebaliknya, asiatic acid dan madecassic acid dicirikan oleh struktur triterpenoid pentasiklik tanpa komponen glikosida ^{38,39}. Asiatic acid mengandung tiga gugus hidroksil yang terletak secara strategis pada cincin A dan satu gugus karboksil (COOH) pada cincin E ^{38,41}. Madecassic acid memiliki empat gugus hidroksil, dengan tiga terletak pada cincin A dan satu gugus OH tambahan yang meningkatkan sifat hidrofiliknya ⁴². Kedua senyawa ini memiliki

gugus karboksil yang memfasilitasi interaksi dengan protein-protein regulator yang terlibat dalam proses *photoaging*³⁹.

Mekanisme pencegahan *photoaging* dari senyawa-senyawa ini beroperasi melalui dua jalur. Pertama, aktivitas antioksidan mereka melibatkan donasi hidrogen dan transfer elektron untuk menetralkan reactive oxygen species (ROS). Struktur cincin terkonjugasi dalam keempat senyawa ini memungkinkan delokalisasi elektron, memberikan stabilitas setelah donasi elektron dan memungkinkan siklus redoks yang efisien^{37,41-44}. Kedua, senyawa-senyawa ini berpartisipasi dalam pensinyalan molekuler dengan berinteraksi dengan target seluler spesifik. Mereka dapat memodulasi protein-protein regulator kunci seperti SIRT1, AP-1, dan NF-κB, yang mempengaruhi ekspresi MMP-1 dan degradasi kolagen^{37,42,45,46}.

Posisi strategis gugus fungsional pada setiap senyawa berkontribusi pada peran spesifik mereka dalam pencegahan *photoaging*. Gugus hidroksil berpartisipasi dalam reaksi redoks dengan radikal bebas yang dihasilkan oleh paparan UV, sementara gugus karboksil dalam asiatic acid dan madecassic acid memfasilitasi interaksi dengan protein yang terlibat dalam regulasi matriks ekstraselular^{39,46}. Bagian glikosida dalam asiaticoside dan madecassoside meningkatkan penyerapan seluler dan penargetan reseptor seluler spesifik, sementara inti triterpene mereka memberikan stabilitas struktural yang diperlukan untuk aktivitas

biologis yang berkelanjutan^{37,40}. Karakteristik struktural ini secara kolektif memungkinkan senyawa-senyawa tersebut untuk melindungi kulit melalui berbagai mekanisme molekuler, menjadikan mereka agen yang efektif dalam mencegah penuaan kulit akibat UV melalui aktivitas antioksidan dan jalur pensinyalan molekuler.

Senyawa-senyawa ini telah dipelajari secara ekstensif untuk potensi terapeutiknya terutama dalam konteks kesehatan kulit. Asiaticoside juga dapat meningkatkan penyembuhan luka, aktivitas anti-inflamasi, dan antioksidan sehingga menjadikannya agen terapeutik yang menjanjikan untuk penyembuhan luka yang tertunda pada pasien diabetes⁴⁷. Investigasi terhadap komponen fitokimia *Centella asiatica* telah dilakukan untuk mengevaluasi potensi anti-dermatitisnya. Studi eksperimental menggunakan model tikus dengan dermatitis atopik menunjukkan hasil yang signifikan dalam menekan respon inflamasi. Temuan ini mengindikasikan prospek yang menjanjikan untuk aplikasi terapeutik *Centella asiatica* dalam penanganan kondisi dermatologis inflamatoris⁴⁸.

Tabel 2.1. Profil Fitokimiawi ekstrak *Centella asiatica*⁴⁹⁻⁵¹

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

2.3.3. Efek Ekstrak *Centella asiatica* dalam mencegah kerusakan kulit akibat UVB

Centella asiatica telah menunjukkan efek perlindungan terhadap kerusakan yang diinduksi oleh UVB pada fibroblas kulit manusia. Sebuah studi menunjukkan bahwa kombinasi *Centella asiatica* dan *Agastache rugosa* (AR) memiliki efek perlindungan sinergis terhadap kerusakan yang diinduksi UVB, meningkatkan

viabilitas sel, dan menunjukkan potensi penggunaannya dalam nutrisi fungsional dan preparat kosmetik ⁵². Penelitian lain menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak *Centella asiatica* menunjukkan aktivitas inhibisi tirosinase yang kuat, menyoroti potensinya sebagai agen anti-melanogenesis melalui berbagai jalur molekuler yang melibatkan keratinosit, melanosit, fibroblas, dan sel endotel ⁴³. Nanoenkapsulasi *Centella asiatica* dan minyak esensial Bergamot dalam formulasi gel menunjukkan efek pencegahan yang signifikan terhadap pembentukan kerutan yang diinduksi UVB, eritema kulit, stres oksidatif (Produksi ROS yang berlebihan dan tidak dapat dinetralkan oleh sistem antioksidan tubuh yang merupakan pemicu utama inflamasi dan kerusakan seluler), dan respon inflamasi secara *in vivo* sehingga menunjukkan potensinya untuk mencegah stres oksidatif dan respon inflamasi yang diinduksi UVB ⁵³.

Triterpen dari *Centella asiatica* khususnya asam asiatik, telah menunjukkan sifat antioksidan dan mengurangi stres oksidatif serta peradangan yang diinduksi UVB pada berbagai jenis sel, termasuk fibroblas kulit, makrofag, dan sel endotel ⁵⁴. Ekstrak murni dari *Centella asiatica* telah terbukti melindungi DNA dari kerusakan yang diinduksi UVB, mengurangi ekspresi sitokin pro-inflamasi, serta menunjukkan sifat anti-inflamasi dan anti-glikasi, menunjukkan potensinya dalam produk perawatan kulit untuk perlindungan UVB

dan efek anti-penuaan ⁵⁵. Selain itu, kultur kalus *Centella asiatica* telah terbukti menghasilkan metabolit bioaktif dengan aktivitas antioksidan dan anti-penuaan kulit, menunjukkan potensinya sebagai agen anti-penuaan dalam preparasi kosmetik ⁵⁶.

Standarisasi ekstrak *Centella asiatica* masih menjadi tantangan sehingga menghambat penerapannya secara umum dalam produk perawatan kulit. Studi keamanan jangka panjang lebih lanjut diperlukan untuk menetapkan efikasi dan keamanannya untuk penggunaan jangka panjang ⁵⁷. Selain itu, rendahnya tingkat bukti dan kurangnya keterlibatan pasien dalam studi klinis tentang efek *Centella asiatica* pada penyakit kulit menunjukkan perlunya uji klinis terkontrol jangka panjang yang lebih ketat untuk mengkonfirmasi potensi penuhnya sebagai agen terapeutik ⁵⁸.

2.4. Ultraviolet B (UVB)

2.4.1. Definisi UVB dan perannya dalam *photoaging* dan kerusakan ECM

Sinar UV, terutama radiasi UVA dan UVB, merupakan faktor lingkungan utama yang menyebabkan *photoaging* ^{59,60}. Radiasi UVB memiliki karakteristik panjang gelombang lebih pendek dengan rentang panjang gelombang 290 hingga 320 nm. Sebagian besar UVB diserap oleh lapisan stratum korneum sehingga menyebabkan eritema dan perubahan pada epidermis ⁵⁹. UVB mencakup kurang dari 0,5% sinar matahari yang mencapai permukaan bumi dan

terutama bertanggung jawab atas sebagian besar kerusakan kulit terkait sinar matahari yang akut dan kronis ⁶¹.

Paparan UVB secara kronis dapat mengakibatkan kerusakan DNA yang kumulatif dan meningkatkan stres oksidatif, menjadikannya salah satu komponen sinar matahari yang paling berbahaya bagi kulit ⁶². Penelitian menunjukkan bahwa radiasi UVB menyebabkan kerusakan kulit yang lebih cepat dan lebih signifikan dibandingkan dengan radiasi UVA ⁶³. Paparan radiasi UVB dapat menyebabkan kulit terbakar, imunosupresi, penuaan kulit, dan karsinogenesis ^{64,65}. Beberapa efek dari radiasi UVB pada kulit meliputi peradangan akut, keratinisasi abnormal, hiperpigmentasi, pembentukan kerutan, dan karsinogenesis ⁶⁶. Radiasi UVB dapat merusak DNA, mengoksidasi lipid, dan menghasilkan radikal bebas berbahaya sehingga menyebabkan peradangan dan melemahkan respon imun kulit. Paparan kronis radiasi UVB memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang mengarah pada oksidasi protein, peroksidasi lipid, dan perubahan jalur sinyal ⁶⁷. Proses ini mengaktifkan kaskade penuaan kulit yang bertanggung jawab atas pembentukan kerutan dan *photoaging* ⁶⁸.

Penelitian telah menunjukkan bahwa iradiasi UVB menghasilkan produksi MMP yang berlebihan, yang menyebabkan degradasi kolagen ^{69,70}. Paparan UVB menginduksi ekspresi MAPK, AP-1, dan NF- κ B, yang memengaruhi ekspresi matrix MMP ^{71,72}.

MMP bertanggung jawab untuk degradasi komponen ECM seperti kolagen ^{73,74}. Paparan UVB meningkatkan ekspresi MMP dan menguraikan Col1 serta protein ECM lainnya ⁷⁵. Radiasi UVB mengaktifkan jalur p38, c-Jun-amino-terminal kinase (JNK), dan ERK untuk merangsang produksi MMP-1 ⁷³.

Paparan UVB mengaktifkan jalur sinyal NF-kB dan MAPK, yang mengarah pada produksi molekul inflamasi dan protein penguraian kolagen ⁷⁶. Netosis yang diinduksi UVB merupakan proses yang melibatkan pelepasan *neutrophil extracellular traps* (NETs). Proses ini terjadi karena produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan mungkin berkontribusi pada *photoaging* kulit ⁷⁷.

Paparan UVB secara signifikan memengaruhi regulasi jalur Janus Kinase / *Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT), proses penting dalam *photoaging*. Mekanisme molekuler melibatkan aktivasi protein dan jalur spesifik yang mengubah perilaku seluler dan ekspresi gen. Respon terhadap radiasi UVB ini beragam dan melibatkan banyak kaskade pensinyalan. Radiasi UVB memicu ekspresi Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP), yang memainkan peran penting dalam mengaktifkan jalur JAK/STAT. CIRP mempromosikan fosforilasi (penambahan fosfat) protein famili JAK, terutama JAK2 dan JAK3, pada keratinosit. Peristiwa fosforilasi ini sangat penting untuk aktivasi STAT3

selanjutnya, faktor transkripsi yang penting untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel ⁷⁸.

Aktivasi STAT3 oleh UVB semakin diintensifkan oleh keterlibatan NF- κ B, faktor hilir yang diatur oleh CIRP. Ketika NF- κ B dihambat, fosforilasi STAT3 berkurang sehingga menggarisbawahi peran pentingnya dalam kaskade pensinyalan yang dimulai oleh paparan UVB ⁷⁸. Stres oksidatif berperan penting dalam mengubah berbagai jalur pensinyalan, termasuk jalur JAK/STAT. Kehadiran ROS mengaktifkan gen pro-inflamasi dan memodulasi pensinyalan JAK/STAT sehingga memperburuk *photoaging* dan meningkatkan risiko fotokarsinogenesis ⁷⁹.

Aktivasi jalur JAK/STAT oleh UVB terkait erat dengan perubahan ECM, termasuk peningkatan MMP dan penurunan kadar kolagen dan elastin yang merupakan ciri khas *photoaging* ⁷⁹. Strategi fotoprotektif seperti penggunaan fitokimia bertujuan untuk mengurangi efek UVB pada jalur ini. Agen pelindung ini membantu menjaga keseimbangan antioksidan seluler dan menghambat kaskade pensinyalan berbahaya yang dipicu oleh paparan UVB ⁷⁹.

Aktivasi jalur JAK/STAT yang diinduksi UVB terbukti sebagai kontributor utama *photoaging*. Perubahan-perubahan yang terjadi termasuk kerusakan DNA, modulasi kekebalan, dan remodeling ECM, yang semuanya berinteraksi dengan jalur JAK/STAT untuk memengaruhi proses penuaan kulit. Pemahaman yang lebih dalam

tentang interaksi ini akan membantu dalam pengembangan strategi komprehensif untuk intervensi fotoproteksi dan anti-penuaan.

2.5. Sediaan Topikal

2.5.1. Definisi sediaan topikal

Obat-obatan topikal didefinisikan sebagai formulasi yang terdiri dari dua komponen mendasar: zat pembawa (vehikulum) dan bahan aktif. Bahan aktif adalah konstituen dalam formulasi topikal yang memberikan kemanjuran terapeutik. Zat pembawa mewakili komponen inert dari sediaan ini. Zat ini bisa dalam keadaan cair atau padat dan berperan memfasilitasi pengiriman bahan aktif ke kulit⁸⁰. Zat pembawa harus menunjukkan kemudahan aplikasi, memfasilitasi penghapusan yang mudah, menunjukkan sifat yang tidak mengiritasi, dan memiliki karakteristik kosmetik yang menarik. Bahan aktif dienkapsulasi dalam zat pembawa dan dirancang untuk mudah dilepaskan setelah aplikasi. Untuk mencapai atribut yang diinginkan dari zat pembawa, berbagai aditif atau elemen dimasukkan ke dalam formulasinya.

Pemahaman komprehensif tentang farmakokinetik kulit sangat penting untuk kemanjuran terapi topikal. Farmakokinetik yang terkait dengan obat-obatan topikal menjelaskan variasi konsentrasi obat setelah penerapannya ke permukaan epidermis, penetrasi melalui penghalang kulit dan jaringan di bawahnya, serta distribusi selanjutnya ke dalam sirkulasi sistemik. Senyawa yang diberikan ke

permukaan kulit, termasuk obat-obatan topikal, menembus kulit sesuai dengan gradien konsentrasi, terutama melalui difusi pasif. Gradien konsentrasi ini ditentukan oleh perbedaan konsentrasi agen farmasi aktif dalam formulasi yang diterapkan dan di dalam kulit dan jaringan di bawahnya, yaitu lapisan dermis dan subkutan. Analisis farmakokinetik mengenai ketersediaan agen topikal yang diterapkan pada kulit mencakup diskusi tentang tiga kompartemen berbeda di mana obat aktif melintasi: kendaraan yang berfungsi sebagai pembawa obat aktif, stratum korneum, dan lapisan yang terdiri dari epidermis dan dermis⁸⁰.

2.5.2. Sediaan krim

Beberapa jenis formulasi topikal termasuk gel, krim, pasta, dan salep. Salah satu bentuk yang paling nyaman untuk penggunaan topikal adalah krim. Krim adalah emulsi semi-padat, terdiri dari dua fase: air dan minyak, yang dicampur bersama menggunakan zat pengemulsi. Krim biasanya diklasifikasikan menjadi krim *oil-in-water* (O/W), di mana tetesan minyak tersebar dalam fase air kontinu, dan krim *water-in-oil* (W/O), di mana tetesan air tersebar dalam fase oil kontinu^{81,82}.

Formulasi berbasis krim memiliki beberapa keunggulan. Mereka menawarkan keseimbangan antara oklusivitas dan hidrasi, membuatnya cocok untuk jenis kulit berminyak dan kering⁸³. Kehadiran komponen air dan minyak memberikan sifat emolien,

membantu kulit tetap lembab, dan kandungan air yang tinggi membantu memberikan sensasi dingin saat diaplikasikan⁸⁴. Krim bersifat elegan secara kosmetik, karena mudah menyebar dan menyerap dengan baik ke dalam kulit tanpa meninggalkan residu berminyak⁸⁵. Konsistensinya yang lebih kental dibandingkan dengan gel membuatnya cocok untuk digunakan pada area kulit normal dan sensitif, termasuk area peradangan atau iritasi⁸³.

Bahan pengemulsi yang digunakan dalam formulasi krim memastikan stabilitas fase air dan minyak, mencegah pemisahan bahan selama penyimpanan⁸⁵. Pengemulsi umum termasuk *cetyl alcohol*, asam stearat, dan gliseril stearat, yang membantu menjaga konsistensi dan tekstur krim yang halus⁸¹. Krim juga dapat diperkaya dengan bahan aktif tambahan, seperti antioksidan, agen anti-inflamasi, atau pelembab seperti gliserin, lanolin, atau asam hialuronat⁸⁵. Fase air dapat terdiri dari ekstrak berair, air suling, atau zat penghidrasi.

Krim hidrofilik (O/W) lebih mudah dicuci dengan air dan cocok untuk kondisi yang membutuhkan lebih sedikit oklusi⁸². Mereka memungkinkan kulit bernapas dan biasanya digunakan untuk melembabkan kulit kering atau mengobati iritasi ringan. Krim hidrofobik (W/O), di sisi lain, memberikan lebih banyak oklusi dan perlindungan dari iritasi eksternal. Krim ini sering digunakan dalam kondisi di mana penghalang diperlukan, seperti pada eksim atau

psoriasis, di mana kulit membutuhkan kelembaban dan perlindungan dari kerusakan lebih lanjut ⁸¹.

Kontrol kualitas sediaan krim melibatkan parameter berikut:

1. Sifat organoleptik: Sifat ini mencakup warna, tekstur, bau, dan penampilan krim, yang harus diamati secara visual ^{86,87}.
2. Nilai saponifikasi: Nilai saponifikasi mewakili jumlah alkali yang diperlukan untuk menyaponifikasi sejumlah lemak atau minyak tertentu dalam formulasi. Ini adalah parameter penting dalam menentukan kualitas dan kinerja krim, karena secara langsung memengaruhi stabilitas dan tekstur emulsi ⁸⁷.
3. Penyebaran: Krim harus menyebar dengan mudah di kulit tanpa perlu tekanan berlebihan. Ini memastikan bahwa produk mudah diaplikasikan dan nyaman bagi pengguna ^{87,88}.
4. Pengujian berat jenis mengacu pada rasio kepadatan krim dengan kepadatan air. Ini memberikan informasi tentang konsistensi krim dan penting untuk memastikan keseragaman dalam batch produksi ⁸⁷.
5. Viskositas: Viskositas krim memengaruhi daya menyebar dan kemudahan aplikasinya, serta stabilitas dan ketersediaan hayatinya. Krim viskositas yang lebih tinggi cenderung memiliki daya rekat yang lebih baik tetapi daya menyebar yang lebih rendah ⁸⁷. Polimer atau bahan pengental dapat ditambahkan untuk menyesuaikan viskositas sesuai kebutuhan.

6. pH: pH krim harus diukur segera setelah persiapan. pH ideal untuk krim topikal sesuai dengan pH kulit manusia (4,5-6,5) untuk meminimalkan risiko iritasi ⁸⁸

2.6. Pengaruh Krim Ekstrak *Centella asiatica* terhadap Kadar IL-1 dan Ekspresi Kolagen Tipe III pada Tikus yang Dipapar UVB

2.6.1. Peran krim *Centella asiatica* dalam modulasi respon inflamasi dan pencegahan degradasi kolagen

Krim *Centella asiatica* memberikan efek anti-inflamasi dan anti-penuaan yang signifikan, terutama melalui inhibisi jalur MAPK p38 dan AP-1. Krim *Centella asiatica* meningkatkan kesehatan kulit dan mengurangi tanda-tanda penuaan dengan memodulasi berbagai jalur pensinyalan dan menekan mediator inflamasi. Bagian berikut mengeksplorasi mekanisme dan efek terperinci krim *Centella asiatica* dalam konteks ini. Ekstrak *Centella asiatica* secara efektif menghambat produksi mediator inflamasi utama seperti oksida nitrat (NO), IL-1 β , IL-6 dan TNF- α pada makrofag dan keratinosit. Inhibisi ini bergantung pada dosis, menunjukkan tindakan anti-inflamasi *Centella asiatica* yang kuat ⁸⁹. Ekstrak etil asetat *Centella asiatica* telah menunjukkan kemampuan untuk menurunkan regulasi faktor inflamasi dengan menghambat aktivasi jalur NF- κ B dan JAK/STAT3, yang memainkan peran penting dalam respon inflamasi

Inhibisi *Centella asiatica* terhadap jalur pensinyalan p38-MAPK sangat signifikan dalam mengurangi peradangan, karena jalur ini terlibat dalam produksi sitokin pro-inflamasi. Inhibisi ini membantu mengurangi peradangan pada sel kulit ⁹⁰. *Centella asiatica* kaya akan polifenol dan triterpenoid, yang berkontribusi pada kapasitas antioksidannya yang kuat. Antioksidan ini membantu mengurangi stres oksidatif, kontributor utama penuaan kulit ⁹¹. Studi *docking* molekuler menunjukkan bahwa senyawa dalam *Centella asiatica* berinteraksi dengan protein yang terlibat dalam degradasi kolagen, yang dapat membantu menjaga struktur dan fungsi kulit. Efek pengawetan kolagen ini semakin mendukung potensi anti-penuaan *Centella asiatica* ⁹².

Meskipun studi spesifik yang berfokus pada inhibisi AP-1 tidak dirinci, dampak *Centella asiatica* yang lebih luas pada jalur terkait seperti MAPK menunjukkan bahwa hal itu dapat memengaruhi proses yang dimediasi AP-1, yang terlibat dalam penuaan dan peradangan kulit ⁹⁰. Sementara inhibisi jalur MAPK p38 dan AP-1 memainkan peran sentral dalam efek anti-inflamasi dan anti-penuaan krim *Centella asiatica*, kisaran senyawa bioaktif *Centella asiatica* yang lebih luas meningkatkan kemanjurannya secara keseluruhan. Senyawa ini tidak hanya menargetkan jalur molekuler tertentu tetapi juga menawarkan manfaat tambahan seperti perlindungan antioksidan dan penguatan penghalang kulit. Tindakan

multifaset ini menjadikan *Centella asiatica* bahan yang berharga dalam aplikasi terapeutik dan kosmetik, berkontribusi pada peningkatan kesehatan dan ketahanan kulit.

2.6.2. Mekanisme proteksi krim *Centella asiatica* terhadap kerusakan kulit akibat UVB

Krim *Centella asiatica* terkenal karena kemampuannya menghambat jalur MMP, yang bertanggung jawab atas degradasi kolagen. Inhibisi ini memainkan peran penting dalam menjaga integritas kulit dan meningkatkan penyembuhan luka. Senyawa aktif dalam *Centella asiatica* memodulasi berbagai proses seluler, mencegah pemecahan kolagen dan meningkatkan perbaikan kulit.

Centella asiatica menunjukkan efek inhibisi MMP-1 yang signifikan, yang penting untuk mencegah degradasi kolagen. Ketika dikombinasikan dengan mineral, ekstrak meningkatkan biosintesis kolagen dan memberikan perlindungan terhadap iritasi⁹³. Ekstrak metanol dan fraksinya telah menunjukkan aktivitas inhibisi MMP-1 yang kuat secara *in vitro*, menyoroti potensinya dalam aplikasi perawatan kulit yang ditujukan untuk pelestarian kolagen⁹⁴.

Krim *Centella asiatica* dapat meningkatkan sintesis kolagen dengan memodulasi jalur pensinyalan TGF- β melalui komponen aktifnya asiaticoside. Menariknya, proses ini melewati jalur tradisional TGF- β reseptor I kinase (T β RI kinase), alih-alih mengaktifkan pensinyalan Smad secara independen. Mekanisme ini

tidak hanya merangsang produksi kolagen tetapi juga meningkatkan kesehatan kulit secara keseluruhan.

Asiaticoside menginduksi fosforilasi Smad2 dan Smad3, yang mengarah pada pengikatannya dengan Smad4, yang kemudian bertranslokasi (perpindahan lokasi) ke nukleus untuk meningkatkan sintesis kolagen tipe I pada fibroblas kulit manusia. Jalur ini beroperasi secara independen dari T β RI kinase, seperti yang ditunjukkan oleh ketidakmampuan inhibitor T β RI kinase SB431542 untuk memblokir proses⁹⁵. Stimulasi kolagen yang bergantung pada dosis oleh asiaticoside meningkatkan produksi kolagen tipe I dan III, melampaui efek asam retinoat, agen terkenal untuk induksi kolagen⁹⁶.

2.7. Pengaruh Krim *Niacinamide* terhadap Kadar IL-1 dan Ekspresi Kolagen Tipe III pada Tikus yang Dipapar UVB

2.7.1. Peran krim *Niacinamide* dalam modulasi respon inflamasi dan pencegahan degradasi kolagen

Krim *Niacinamide*, sebagai bentuk aktif dari vitamin B3 (nicotinamide), merupakan agen topikal multifungsi yang menunjukkan sifat anti-inflamasi, antioksidan, dan protektif terhadap struktur kulit, termasuk kolagen. *Niacinamide* telah terbukti mengurangi ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , baik dalam model in vitro maupun in vivo, melalui inhibisi jalur NF- κ B. Jalur ini berperan penting dalam aktivasi inflamasi

yang diinduksi oleh paparan sinar UVB, menjadikan *Niacinamide* agen yang efektif dalam menekan respons inflamasi pada kulit yang rusak akibat sinar ultraviolet ⁹⁷.

Efek anti-inflamasi *Niacinamide* juga didukung oleh kemampuannya menurunkan aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dan prostaglandin E2 (PGE2), yang berperan dalam mediasi nyeri, peradangan, dan eritema setelah paparan UV. Dalam konteks ini, *Niacinamide* memperkuat penghalang kulit dengan meningkatkan ekspresi ceramide, filaggrin, dan involucrin, yang secara tidak langsung menekan peradangan melalui penguatan integritas epidermis ⁹⁸.

Di samping itu, *Niacinamide* menunjukkan aktivitas antioksidan yang membantu mengurangi stres oksidatif akibat paparan sinar UVB, yang merupakan salah satu penyebab utama penuaan kulit dan aktivasi enzim perusak kolagen seperti metaloproteinase matriks (MMP). Dengan menurunkan kadar ROS dan memperbaiki kerusakan DNA, *Niacinamide* berkontribusi pada pemeliharaan homeostasis kulit dan mengurangi proses inflamasi kronis yang merusak dermis ⁹⁷.

Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa *Niacinamide* dapat meningkatkan produksi kolagen tipe I dan III, memperbaiki elastisitas kulit, dan mengurangi garis halus. Mekanisme ini dimediasi oleh aktivasi jalur TGF- β /Smad, serupa dengan

mekanisme regeneratif yang diamati pada bahan aktif lainnya seperti asiaticoside. Dengan cara ini, *Niacinamide* berperan tidak hanya sebagai anti-inflamasi, tetapi juga sebagai agen anti-aging topikal yang efektif.

2.7.2. Mekanisme proteksi krim *Niacinamide* terhadap kerusakan kulit akibat UVB

Paparan UVB menyebabkan peningkatan ekspresi MMP, terutama MMP-1 dan MMP-3, yang berkontribusi pada degradasi serat kolagen dermis. *Niacinamide* menghambat ekspresi MMP-1 yang diinduksi UVB melalui mekanisme penghambatan jalur NF- κ B dan AP-1, yang merupakan faktor transkripsi utama dalam aktivasi MMP. Inhibisi MMP oleh *Niacinamide* membantu melindungi kolagen dermal dari degradasi berlebihan, sehingga menjaga struktur dan kekuatan kulit⁹⁹.

Lebih lanjut, *Niacinamide* juga mengurangi kerusakan DNA akibat UV dengan meningkatkan ekspresi protein perbaikan DNA seperti p53 dan PARP-1¹⁰⁰. Ini penting dalam mencegah apoptosis sel yang disebabkan oleh stres oksidatif dan peradangan kronis. Dengan demikian, *Niacinamide* bekerja pada berbagai level seluler, mulai dari pencegahan kerusakan awal akibat UVB, reduksi inflamasi, hingga stimulasi regenerasi dermis melalui induksi kolagen.

Efek protektif ini menjadikan *Niacinamide* sebagai agen kontrol positif yang relevan dalam penelitian fotoprotektif topikal. Digunakan secara luas dalam kosmetik dermatologis dan klinis, *Niacinamide* menawarkan kombinasi ideal antara keamanan, efektivitas, dan kompatibilitas kulit, terutama dalam model eksperimental seperti tikus Wistar.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan radiasi UVB dapat menyebabkan penuaan kulit dini (*photoaging*) melalui berbagai mekanisme, termasuk kerusakan DNA, peningkatan ROS, dan efek langsung pada komponen matriks ekstraseluler. Iradiasi UVB mengaktifkan jalur pensinyalan seperti p38 MAPK dan NF- κ B, yang mengarah pada peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan IL-1, serta MMP.

Jalur MAPK p38 memainkan peran penting dalam *photoaging*. Ketika diaktifkan oleh ROS dan sinyal stres lainnya, p38 MAPK meningkatkan regulasi ekspresi MMP, terutama MMP-1, MMP-3, dan MMP-9. AP-1 memainkan peran penting dalam regulasi sitokin inflamasi seperti IL-6 dan IL-1, yang terkait dengan degradasi kolagen. Diaktifkan oleh jalur pensinyalan JNK dan p38 MAPK, AP-1 secara langsung mengatur matriks metalloproteinase (MMP), enzim yang memfasilitasi pemecahan kolagen. MMP secara langsung mendegradasi serat kolagen, termasuk yang terdiri dari Col1 dan Col3. Sebaliknya, aktivasi p38 MAPK dapat meningkatkan sintesis kolagen dengan memodulasi pensinyalan TGF- β , berkontribusi pada sintesis kolagen pada kulit yang mengalami *photoaging*.

Jalur JAK-STAT3 memainkan peran penting dalam kulit yang terpapar UVB dengan memediasi peradangan, proliferasi sel, dan respon antiapoptosis. Paparan UVB kronis mengaktifkan JAK1, yang mengarah

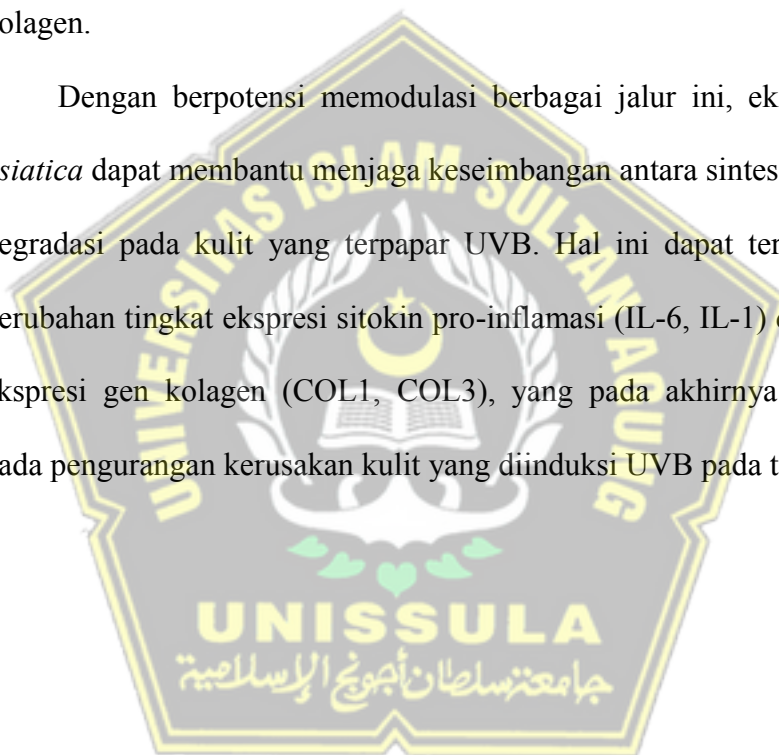
pada aktivasi STAT3, yang mendorong ekspresi penanda proliferasi seperti PCNA dan Cyclin-D1, serta protein antiapoptosis seperti Bcl2 dan Bcl-xl. Peningkatan kadar ROS tidak hanya mengaktifkan jalur yang merusak ini tetapi juga menyebabkan peroksidasi lipid, yang berpotensi memengaruhi integritas dan pensinyalan membran sel. Lingkungan peradangan yang diciptakan oleh peningkatan kadar IL-6 dan IL-1 dapat semakin memperburuk degradasi kolagen dengan mempertahankan produksi MMP dan menghambat sintesis kolagen baru.

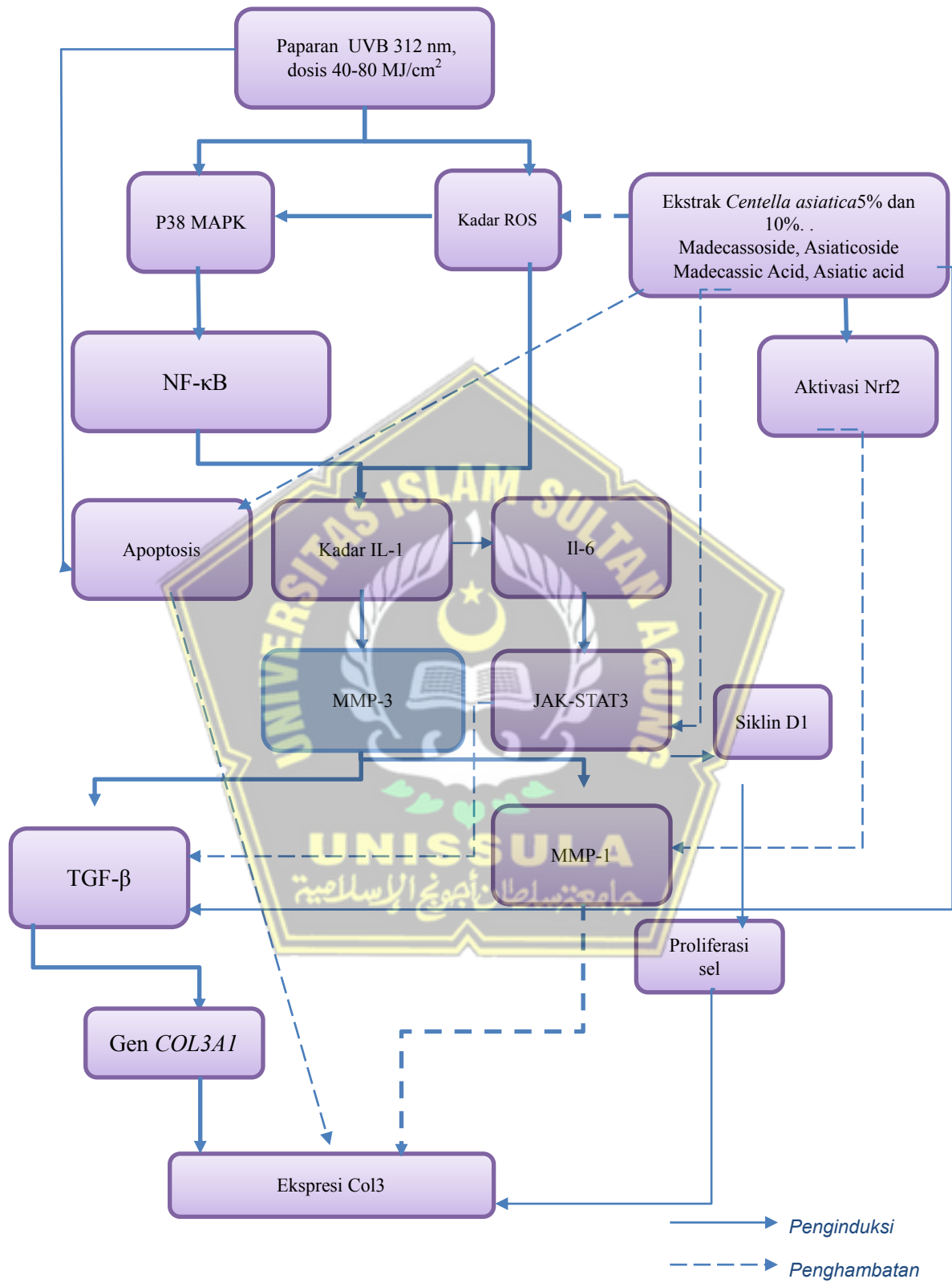
Ekstrak *Centella asiatica*, yang dikenal dengan sifat antioksidan dan anti-inflamasinya, dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan kulit yang diinduksi UVB melalui berbagai mekanisme. Senyawa aktif dalam *Centella asiatica*, seperti asiaticoside dan madecassoside, dapat secara langsung menetralkan ROS, berpotensi mengurangi aktivasi jalur responsif stres seperti p38 MAPK. Komponen *Centella asiatica* dapat mengaktifkan jalur faktor eritroid 2 terkait faktor 2 (Nrf2) faktor nuklir. Ketika diaktifkan, Nrf2 berpindah ke nukleus dan mengatur gen antioksidan, meningkatkan pertahanan antioksidan endogen kulit.

Centella asiatica dapat mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan IL-1 dengan mengurangi kadar ROS dan berpotensi memodulasi pensinyalan NF- κ B. Tindakan anti-inflamasi ini secara tidak langsung dapat melindungi kolagen dengan mengurangi rangsangan inflamasi yang menopang produksi MMP. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* dapat secara langsung

merangsang sintesis kolagen, berpotensi menangkal penekanan produksi kolagen yang diinduksi UVB. Efek ini dapat dimediasi melalui peningkatan pensinyalan TGF- β atau stimulasi langsung aktivitas fibroblas. Sementara penelitian lebih lanjut diperlukan, ada bukti yang menunjukkan bahwa senyawa *Centella asiatica* dapat secara langsung menghambat aktivitas atau ekspresi MMP, memberikan mekanisme tambahan untuk perlindungan kolagen.

Dengan berpotensi memodulasi berbagai jalur ini, ekstrak *Centella asiatica* dapat membantu menjaga keseimbangan antara sintesis kolagen dan degradasi pada kulit yang terpapar UVB. Hal ini dapat tercermin dalam perubahan tingkat ekspresi sitokin pro-inflamasi (IL-6, IL-1) dan perubahan ekspresi gen kolagen (COL1, COL3), yang pada akhirnya berkontribusi pada pengurangan kerusakan kulit yang diinduksi UVB pada tikus Wistar.

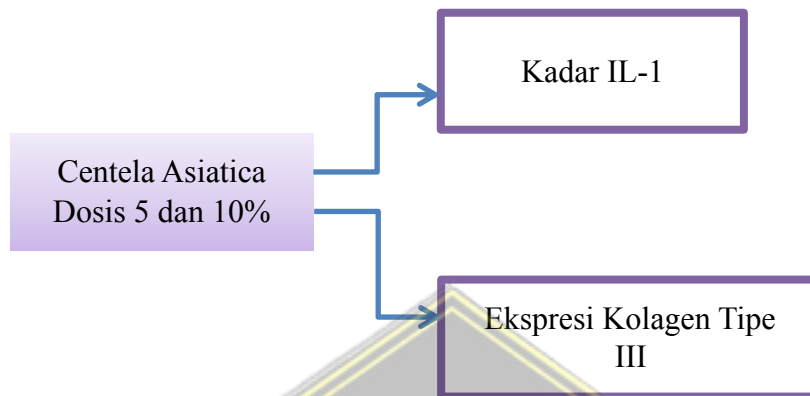




Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep

Konsep penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Aplikasi krim ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5% dan 10% akan berpengaruh pada ekspresi kolagen tipe III dan kadar IL-1 pada kulit tikus Wistar yang dipapar sinar UVB.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

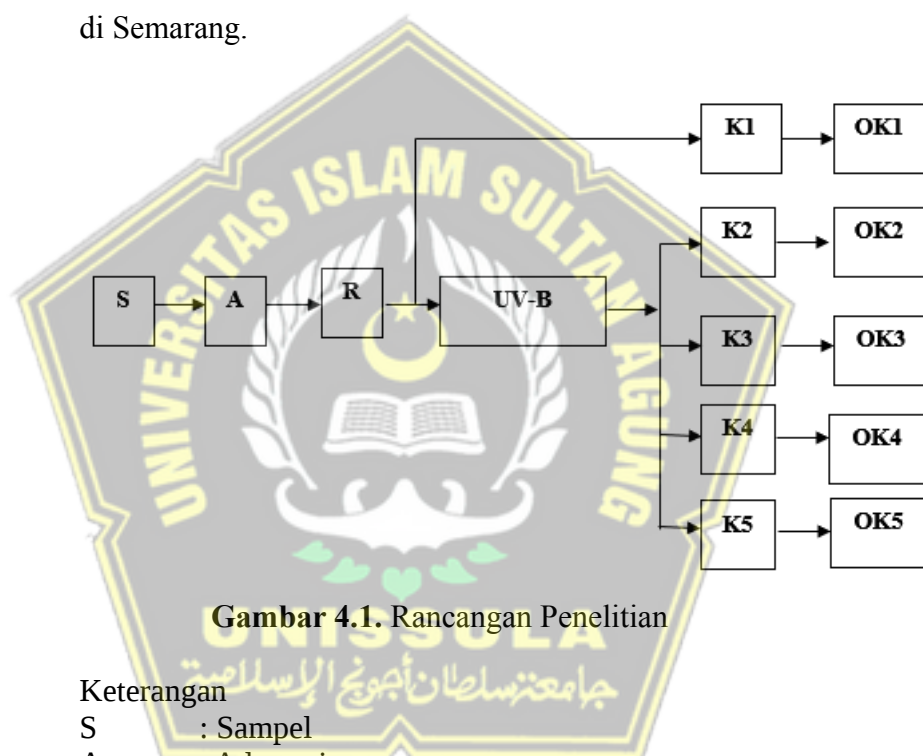
Penelitian ini bersifat eksperimental *in vivo* dengan rancangan *post-test only control group* dengan *completely randomized design* (acak lengkap) di mana hewan uji dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan berdasarkan agen topikal yang diberikan. *Niacinamide* 5% digunakan sebagai kontrol positif karena 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 klinis¹⁰¹. Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. K1 (Tikus sehat tidak diberi paparan UV-B)
2. K2 (Kontrol vehikulum, tikus diberikan krim vehikulum dan dipapar UV-B).
3. K3 (Kontrol positif, tikus diberikan krim *Niacinamide* dosis 5% dan dipapar UV-B)
4. K4 (Perlakuan 1, tikus diberikan krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% dan dipapar UV-B)
5. K5 (Perlakuan 2, tikus diberikan krim ekstrak *Centella asiatica* 10% dan dipapar UV-B).

4.2. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.2.1. Subyek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tikus jenis Wistar jantan (*Rattus Norvegicus*) berusia antara 8 hingga 10 minggu, dengan kisaran berat badan 150 hingga 200 gram, yang diperoleh dari Laboratorium IBL di Universitas Islam Sultan Agung di Semarang.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan

- S : Sampel
- A : Adaptasi
- R : Randomisasi
- O : Observasi

4.2.2. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus Wistar jantan berwarna putih dengan berat badan 150–200 gram dan usia 8–10 minggu. Hewan coba memiliki kulit normal dan sehat tanpa luka, lesi, atau tanda-tanda infeksi, serta tidak pernah digunakan dalam

penelitian lain sebelumnya. Selama penelitian, tikus diberi pakan standar dengan akses *ad libitum* (tanpa batasan/sesuai keinginan) terhadap makanan dan air, dan ditempatkan dalam kondisi lingkungan standar dengan siklus terang–gelap 12 jam, suhu $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, serta kelembaban $55 \pm 10\%$.

4.2.3. Kriteria Inklusi dan *Drop Out*

4.2.3.1. Kriteria Inklusi

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

4.2.3.2. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang masuk kriteria *drop out* pada penelitian ini adalah tikus mati selama penelitian.

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Penelitian

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

3. Pemberian *Niacinamide* topikal dengan konsentrasi 5%

4.3.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Ekspresi kolagen tipe III (COL3)
2. Kadar Interleukin 1 (IL-1)

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Krim ekstrak *Centella asiatica*

Krim yang mengandung ekstrak *Centella asiatica* yang didapatkan dari perkebunan daerah Tawangmangu dengan konsentrasi 5% dan 10% dibuat di laboratorium kimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan diaplikasikan dua kali sehari pada area kulit punggung tikus selama 14 hari.^{146,147}

Unit : mg

Skala : Nominal

4.3.2.2. Krim *Niacinamide*

Krim yang mengandung *Niacinamide* dengan konsentrasi 5% berasal dari PT Derma Konsep Estetika dan diaplikasikan dua kali sehari pada area kulit punggung tikus selama 14 hari²⁹

Unit : mg

Skala : Nominal

4.3.2.3. Kolagen tipe III

Ekspresi kolagen tipe III (COL3) adalah ekspresi protein kolagen tipe III yang terdapat pada jaringan kulit punggung tikus wistar yang terpapar radiasi UVB setelah 14 hari perlakuan. Ekspresi Col3 diukur dengan menggunakan metode IHC pada hari ke-29. Melalui pewarnaan ini, serat kolagen yang terekspresi secara positif dapat diidentifikasi sebagai area berwarna coklat dalam jaringan dermis. Penghitungan atau *scoring* ekspresi COL3 dilakukan secara kuantitatif untuk memperoleh nilai persentase area positif (% Area). Proses ini terdiri dari dua tahapan utama, yakni pengambilan gambar dan analisis gambar. Pada tahap pengambilan gambar, empat area jaringan dengan ekspresi kolagen tipe 3 yang tinggi (*high dense area*) dan tidak saling tumpang tindih dipilih dari setiap preparat (slide). Pengambilan gambar dilakukan secara konsisten menggunakan kamera Optilab pro yang terhubung dengan mikroskop Olympus BX51, dengan mempertahankan konsistensi pencahayaan dan perbesaran mikroskop untuk memastikan seluruh hasil dapat dibandingkan dan dianalisis. Seluruh gambar yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ versi 1.54p. Gambar pertama-tama dikonversi

menjadi skala abu-abu (8-bit) untuk memudahkan analisis kuantitatif. Selanjutnya, fungsi *thresholding* (ambang batas) yang terkalibrasi digunakan untuk memisahkan piksel gambar secara objektif melalui identifikasi ambang batas intensitas warna, di mana semua piksel yang mewakili ekspresi positif (baik coklat tua maupun muda) akan dikonversi menjadi hitam (area positif), dan semua piksel latar belakang (area tidak terekspresi) akan dikonversi menjadi putih. *Software* ImageJ akan digunakan untuk menghitung persentase area yang tertutup oleh piksel hitam terhadap total area jaringan yang dianalisis. Persentase inilah yang digunakan sebagai nilai akhir ekspresi COL3 untuk setiap area pandang.

Unit : % Area

Skala : Rasio

4.3.2.4. IL-1

Kadar IL-1 adalah konsentrasi IL-1 yang diproduksi oleh jaringan kulit pada sampel penelitian yaitu kulit punggung tikus wistar. Kadar IL-1 dianalisis pada hari ke-29 setelah induksi UVB dan pemberian perlakuan menggunakan metode ELISA.

Unit : pg/mL

Skala : Rasio

4.4. Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1. Alat

1. Lampu Phillips narrowband UVB type PL-S 9W/01/2P
2. Rangkaian pencahayaan UVB dengan penyangga dan pengatur jarak (± 27 cm)
3. Kotak akrilik atau bahan transparan tahan panas berpori
4. Lembaran aluminium foil
5. Alat anestesi (syringe, jarum, kapas alkohol, sarung tangan steril)
6. Timbangan analitik
7. pH meter
8. Vortex mixer
9. Homogenizer
10. Sentrifuge
11. Microplate reader (ELISA reader)
12. Mikroskop Olympus BX51
13. Kamera Optilab pro
14. Software ImageJ 1.54p
15. Alat preparasi histologi:
 - Pisau bedah dan pinset
 - Botol fiksasi (formalin 10%)
 - Jaringan parafin, mikrotom, dan kaca objek
16. Inkubator (untuk inkubasi antibodi primer/sekunder IHC)

4.4.2. Bahan

1. Ekstrak *Centella asiatica* (10g)
2. Etanol 70%
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. Krim *Niacinamide* konsentrasi 5%
11. Kit ELISA untuk IL-1
12. Antibodi primer anti-kolagen tipe III
13. Antibodi sekunder terkonjugasi HRP (Horseradish Peroxidase)
: enzim yang akan bereaksi dengan substrat untuk menghasilkan warna coklat.

4.5. Cara Penelitian dan Alur Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Permintaan persetujuan etika yang berkaitan dengan studi penelitian ini secara resmi disampaikan kepada komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak *Centella asiatica*

Ekstrak *Centella asiatica* diperoleh melalui maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1000 gram simplisia kering yang berasal dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu 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* dilakukan dengan menggunakan basis krim standar (plasebo) yang kemudian ditambahkan ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi 5% dan 10% dalam wadah terpisah yang telah disiapkan.

Pembuatan basis krim dimulai dengan meleburkan fase minyak yang terdiri dari asam stearat, setil alkohol, dan propil paraben di atas penangas air. Secara bersamaan, fase air yang terdiri dari trietanolamin, gliserin, metil paraben, dan aquades juga dipanaskan di atas penangas air. Setelah kedua fase mencapai suhu yang sesuai, fase minyak dituangkan ke dalam mortir panas, kemudian fase air ditambahkan sedikit demi sedikit sambil digerus hingga terbentuk basis krim homogen.

Tabel 4.1. Formula Basis Krim ¹⁰²

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

Setelah basis krim terbentuk dan mencapai suhu sekitar 40–50°C ¹⁰³, ekstrak *Centella asiatica* ditambahkan sesuai dosis yang telah ditentukan (2,5 gram untuk krim 5% dan 5 gram untuk krim 10%). Campuran tersebut kemudian diaduk terus-menerus hingga homogen, memastikan ekstrak terdispersi dengan sempurna dalam basis krim. Pembuatan basis krim dilakukan di Gedung Integrated Biomedical Laboratory (IBL), Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Proses ini melibatkan formulasi krim dengan penambahan ekstrak *Centella asiatica* pada konsentrasi yang telah ditentukan.

Setiap dosis krim dibuat sebanyak 50 gram. Untuk krim dengan konsentrasi 5%, digunakan 47,5 gram basis krim, yang kemudian ditambahkan 2,5 gram ekstrak *Centella asiatica*. Sementara itu, untuk krim dengan konsentrasi 10%, digunakan 45 gram basis krim, dengan tambahan 5 gram ekstrak *Centella asiatica*. Semua bahan dicampur hingga homogen untuk memastikan ekstrak terdistribusi secara merata dalam sediaan krim.

4.5.4. Penetapan Dosis

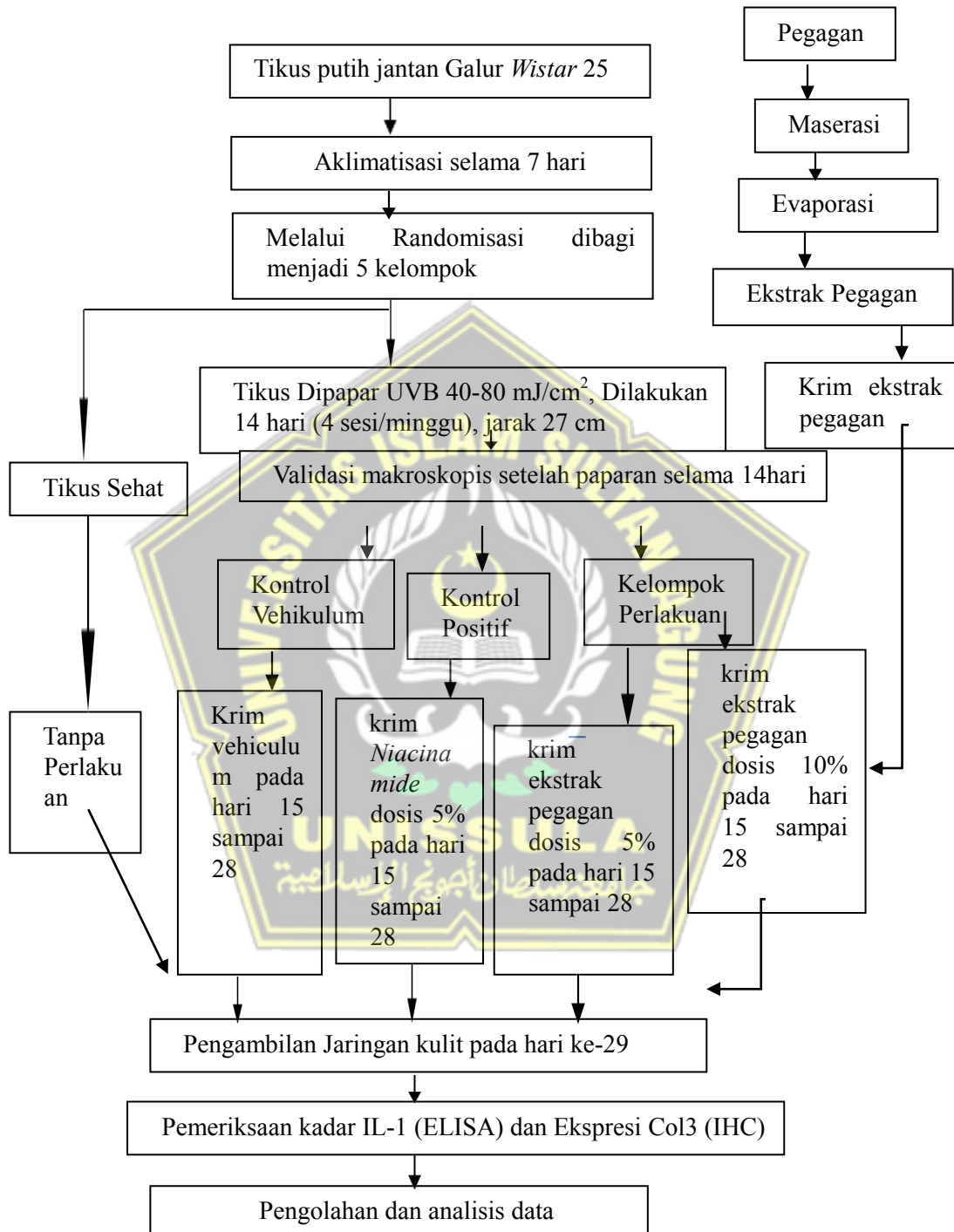
Dosis untuk pemberian topikal ekstrak *Centella asiatica* ditetapkan melalui tinjauan literatur yang ada. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi 10% ekstrak *Centella asiatica* menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan ¹⁰⁴. Studi tambahan menggunakan konsentrasi 5%, mengonfirmasi kemampuan antioksidan ekstrak ¹⁰⁵. Penelitian ini menerapkan konsentrasi 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 ^{106,107}, dosis 2 Minimal Erythema Dose (MED, 40–80 mJ/cm²) ¹⁰⁷, serta sesi berulang selama beberapa minggu untuk menginduksi perubahan struktural pada kulit, termasuk degradasi kolagen ^{106,108}. Studi *photoaging* oleh Altman *et al* telah menerapkan standar Jarak paparan sejauh 27 cm ¹⁰⁹. 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. Anestesi diberikan secara intramuskular dengan kombinasi ketamin (100 mg/kg berat badan) dan xylazine (10 mg/kg berat badan), dengan volume injeksi total sebesar 0,5 mL.
3. Bulu punggung tikus dipangkas dengan tepat menjadi persegi 4x4 cm.
4. Daerah punggung tikus dipaparkan sinar UVB dari lampu TL 20W/12 RS SLV/25 (312 nm) pada jarak 27 cm dari sumber cahaya, dengan dosis 2 Minimal Erythema Dose (MED) sebesar 40–80 mJ/cm² selama 30 menit per sesi, sebanyak 8 sesi dalam 14 hari ^{110,111}. Paparan dilakukan dalam ruangan gelap yang disesuaikan untuk iradiasi, dengan tikus ditempatkan secara individual dalam kotak akrilik berpori untuk menjaga ventilasi dan membatasi gerakan, sehingga hanya daerah punggung yang terbuka yang terkena sinar. Posisi dan jarak antara sumber UVB dan kulit punggung diukur secara konsisten menggunakan penggaris laser dan statif yang distabilkan. Untuk mencegah paparan ke area lain, tubuh tikus selain punggung ditutupi dengan lembaran aluminium foil.
5. Dampak paparan UVB sub-akut pada kulit dievaluasi secara makroskopis.

4.6. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.7. Teknik Pengumpulan Sampel

4.7.1. Cara pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan melalui seleksi acak. Tikus putih strain Wistar jantan dikategorikan menjadi lima kelompok yang berbeda: kelompok sehat, kelompok Kontrol Positif (tikus yang terkena paparan UVB dengan aplikasi topikal *Niacinamide* 5%), Kelompok Kontrol Vehiculum (tikus yang terkena paparan UVB dengan aplikasi topikal Krim vehikulum) dapat juga disebut plasebo, dan Kelompok Perlakuan (tikus yang terkena paparan UVB dengan aplikasi topikal 5% dan 10% krim ekstrak *Centella asiatica*). Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-29 pasca-paparan UVB dan pemberian perlakuan untuk mengevaluasi perubahan IL-1, Col-3.

4.7.2. Besar 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.

4.7.3. 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. Sampel kulit yang diperoleh dimanfaatkan untuk analisis kadar IL-1 menggunakan metode ELISA dan ekspresi kolagen tipe 3 menggunakan metode IHC.

4.7.4. Analisis Kadar IL-1 menggunakan ELISA

Sampel kulit dihancurkan menggunakan homogenizer dalam buffer lisis yang mengandung protease inhibitor. Plate ELISA dilapisi dengan antibodi terhadap IL-1 kemudian diinkubasi dengan sampel yang telah diekstrak. Setelah inkubasi, plate dicuci dan ditambahkan larutan deteksi yang mengandung konjugat enzim. Setelah penambahan substrat, absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan microplate reader.

4.7.5. Analisis Ekspresi Kolagen Tipe III Menggunakan IHC dan ImageJ

Proses analisis ekspresi kolagen tipe III dilakukan setelah pengambilan sampel jaringan yang telah melewati proses immunohistokimia (IHC). Metode IHC dipilih untuk analisis ekspresi kolagen tipe III karena memiliki spesifisitas tinggi, memungkinkan deteksi jenis kolagen tertentu menggunakan antibodi spesifik, yang tidak dapat dilakukan oleh pewarnaan histologis standar seperti Masson's Trichrome ¹¹². Selain itu, IHC memberikan visualisasi spasial yang jelas, memungkinkan pengamatan langsung distribusi dan pola serabut kolagen dalam jaringan, yang tidak bisa diperoleh melalui Western Blot atau PCR yang hanya menunjukkan ekspresi protein secara global tanpa konteks jaringan ¹¹³. Metode ini juga mendukung kuantifikasi objektif menggunakan analisis citra digital, sehingga hasilnya lebih akurat dan dapat distandarisasi dibandingkan metode pewarnaan histologis yang lebih subjektif ¹¹⁴. Keunggulan lainnya adalah sensitivitas tinggi, memungkinkan deteksi kolagen dalam jumlah kecil tanpa kehilangan informasi struktural atau modifikasi pasca-translasi ¹¹⁵. Dengan semua kelebihan ini, IHC menjadi metode pilihan utama dalam analisis ekspresi kolagen tipe III dibandingkan metode lain. Metode IHC bertujuan untuk mewarnai kolagen, sehingga memudahkan pengamatan serabut kolagen di bawah mikroskop. Tahapan awal IHC meliputi deparafinasi sampel

jaringan yang sebelumnya sudah dibekukan, kemudian dilakukan rehidrasi melalui serangkaian penurunan konsentrasi alkohol. Setelah itu, sampel diproses dengan *heat-induced antigen retrieval* (pemulihan antigen) untuk meningkatkan visibilitas epitope target, diikuti dengan pemberian blokade non-spesifik^{116,117}. Sampel kemudian diinkubasi dengan antibodi primer spesifik terhadap kolagen (misalnya kolagen tipe I dan III) yang kemudian diikuti oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim peroksidase atau fluorokrom^{118,119}. Penambahan substrat memungkinkan terbentuknya hasil warna atau fluoresensi yang memvisualisasikan serabut kolagen. Setelah pewarnaan selesai, preparat dipasang pada slide kaca dan disiapkan untuk pengamatan mikroskopik.

Di bawah mikroskop, serabut kolagen akan diamati berdasarkan distribusi, morfologi, dan struktur keseluruhan jaringan. Pada fase ini, kami akan melakukan pemilihan area jaringan dengan ekspresi kolagen tipe III yang tinggi (*high dense area*) secara konsisten pada setiap kelompok untuk diambil gambarnya menggunakan kamera digital yang terhubung dengan mikroskop. Distribusi serabut juga diperhatikan untuk melihat apakah terdapat perbedaan pola antar kelompok eksperimen. Pengambilan gambar dilakukan dengan mempertimbangkan konsistensi dalam pencahayaan dan perbesaran mikroskop agar hasil yang diperoleh dapat dianalisis dengan baik.

Selanjutnya, gambar yang telah diambil dari masing-masing sampel dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ. Proses ini dimulai dengan konversi gambar menjadi skala abu-abu untuk memudahkan analisis kuantitatif. Dengan menggunakan fungsi thresholding, peneliti dapat membedakan serabut kolagen dari latar belakang jaringan. Area yang mengandung serabut kolagen akan dihitung persentasenya terhadap total area jaringan dalam gambar tersebut¹²⁰. Persentase ini digunakan untuk menentukan tingkat kolagen tipe III dalam setiap sampel. Setiap kelompok eksperimen dibandingkan untuk melihat pengaruh paparan UVB dan aplikasi krim ekstrak *Centella asiatica* terhadap ekspresi kolagen tipe III.

4.8. Metode Analisis Data

Data dianalisis secara komprehensif menggunakan statistik deskriptif, penilaian normalitas, dan tes homogenitas. Selanjutnya, uji Shapiro-Wilk digunakan untuk mengevaluasi normalitas distribusi data, sedangkan uji Levene digunakan untuk menilai homogenitas varians. Dalam kasus di mana data menunjukkan distribusi normal dan varians homogen, uji ANOVA Satu Arah parametrik akan dilakukan, diikuti oleh analisis *Post Hoc* menggunakan tes Tukey untuk memastikan perbedaan antar kelompok. Sebaliknya, jika data menampilkan distribusi abnormal dan varians heterogen, uji Kruskal-Wallis akan dijalankan, dengan penerapan selanjutnya dari uji Dunn untuk mengevaluasi perbedaan kelompok. 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 10.3.0 untuk sistem operasi Windows 11.

4.9. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Gedung Integrated Biomedical Laboratory (IBL) Universitas Islam Sultan Agung Semarang untuk metode ELISA dan Laboratorium Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta untuk metode IHC, pada bulan Juni – September 2025.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

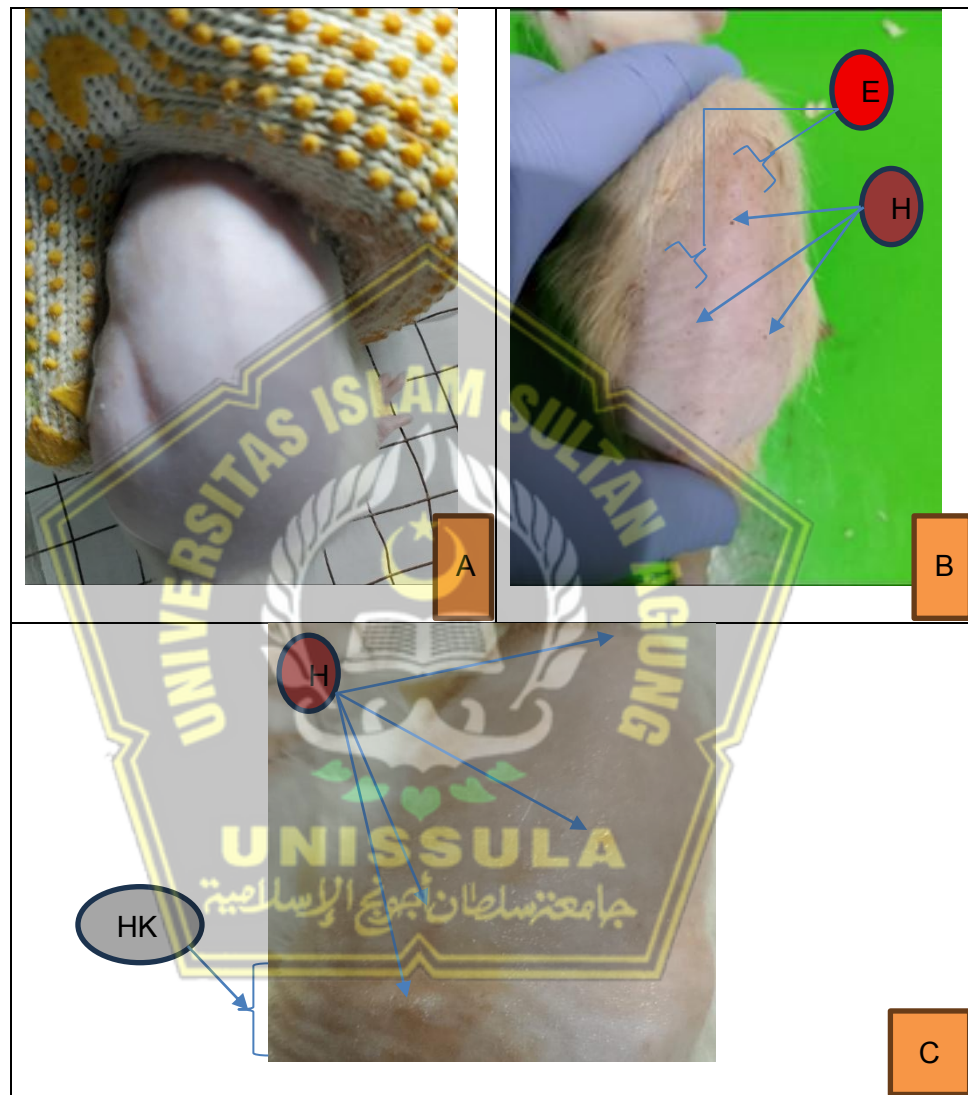
5.1.1. Evaluasi Makroskopis Kulit Punggung Tikus

Pengamatan visual secara makroskopis dilaksanakan untuk mengevaluasi perubahan kondisi kulit punggung tikus selama periode paparan UVB. Dokumentasi fotografis dilakukan pada tiga titik waktu: awal (Hari ke-0), pertengahan (Hari ke-7), dan akhir (Hari ke-14) masa paparan (Gambar 5.1).

Pada awal paparan (Gambar 5.1 A), kulit punggung tikus yang telah dicukur menunjukkan kondisi sehat, ditandai dengan permukaan yang halus, elastis, berwarna putih-krem, dan bebas dari lesi, eritema, maupun pigmentasi berlebih. Memasuki Hari ke-7 paparan (Gambar 5.1 B), tanda-tanda awal jejas kulit mulai terlihat, seperti eritema ringan dan beberapa makula hiperpigmentasi yang kecil dan tersebar.

Pada Hari ke-14 (Gambar 5.1 C), kerusakan kulit tampak jelas dan progresif. Dibandingkan minggu pertama, bercak pigmentasi menjadi lebih banyak, lebih besar, dan lebih pekat. Kulit juga teramati menebal, menjadi kasar, dan menunjukkan kerutan halus, yang merupakan indikasi respons hiperkeratosis (penebalan abnormal pada lapisan luar kulit atau stratum korneum). Perubahan makroskopis yang signifikan ini mengonfirmasi keberhasilan model

induksi kerusakan kulit (*photoaging*) akibat paparan UVB sub-akut, yang menandakan hewan coba telah siap untuk memasuki tahap perlakuan.



Gambar 5.1. Progresi Kerusakan Makroskopis Kulit Punggung Tikus Akibat Paparan UVB. Bercak hiperpigmentasi diberi tanda H dengan anak panah, Eritema diberi tanda E dengan anak panah, dan Hiperkeratosis diberi tanda HK dengan anak panah.

5.1.2. Hasil analisis kadar IL-1 jaringan kulit pada tiap kelompok

Hasil analisis kadar Interleukin-1 (IL-1) dalam jaringan kulit tikus setelah perlakuan dan paparan sinar UVB disajikan pada Tabel

5.1. Rata-rata kadar IL-1 pada kelompok tikus sehat tanpa paparan UVB (K1) adalah $53,65 \pm 9,267$ pg/ml. Kelompok tikus yang diberikan krim vehikulum dan dipaparkan UVB (K2) menunjukkan kadar sebesar $86,40 \pm 6,746$ pg/ml. Pada kelompok tikus yang diberikan krim *Niacinamide* 5% dan dipaparkan UVB (K3), kadar IL-1 sebesar $37,35 \pm 19,98$ pg/ml. Sementara itu, kadar IL-1 pada kelompok yang diberikan krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% (K4) adalah $33,65 \pm 15,74$ pg/ml, dan kelompok dengan dosis 10% (K5) sebesar $68,21 \pm 5,500$ pg/ml.

Tabel 5.1. Hasil analisis statistik rerata kadar IL-1

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Kadar IL-1 (pg/ml)						
Mean	53,65	86,40	37,35	33,65	68,21	
SD	$\pm 9,27$	$\pm 6,75$	$\pm 19,98$	$\pm 15,74$	$\pm 5,50$	
Shapiro-Wilk	0,5016	0,5312	0,2539	0,9799	0,6101	
Levene Test						0.058267
One way ANOVA						<0,0001

Keterangan: Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)
 Levene Test : Homogen ($p > 0,05$)
 One way ANOVA : Signifikan ($p < 0,05$)

Tukey test (P value)	Grup				
	Tikus Sehat (K1)	Krim vehikulum + UVB (K2)	Niacinamide 5% + UVB (K3)	Centella asiatica 5% + UVB (K4)	Centella asiatica 10% + UVB (K5)
K1		0,0048*	0,2895	0,1334	0,3952
K2			<0,0001*	<0,0001*	0,1985
K3				0,9900	0,0081*
K4					0,0029*

Keterangan: $p < 0,05$ signifikan secara statistik

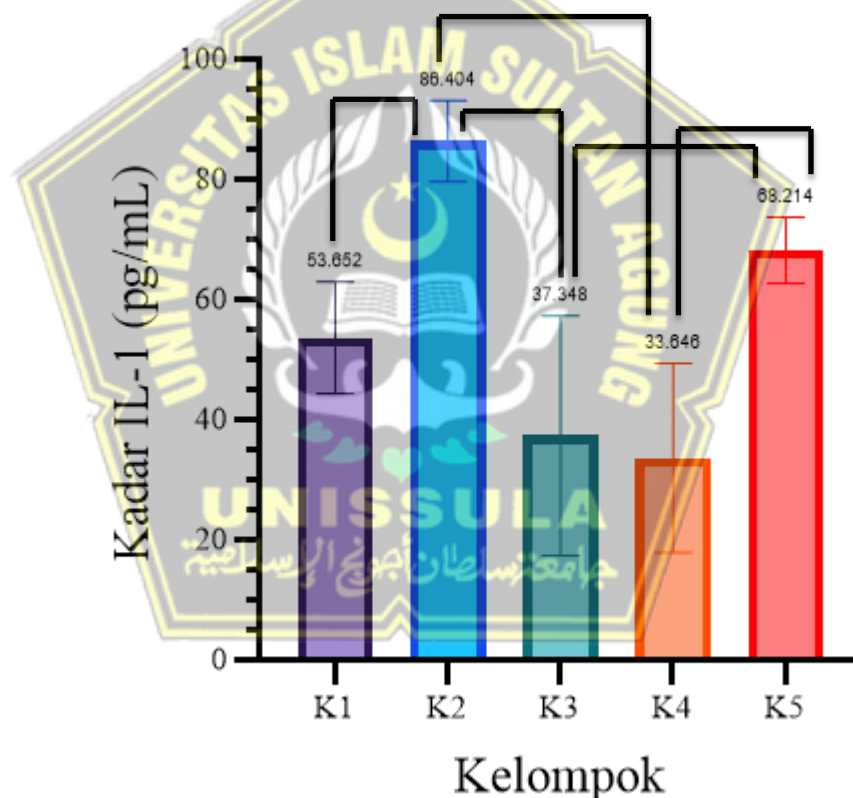
Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Uji

homogenitas varians menggunakan *Levene's Test* menghasilkan nilai $p = 0.058267$ ($p > 0,05$), yang mengindikasikan bahwa variansi antarkelompok bersifat homogen. Dengan terpenuhinya asumsi normalitas dan homogenitas, dilakukan uji statistik parametrik menggunakan *One-Way ANOVA*. Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,0001$ ($p < 0,05$), yang mengindikasikan adanya perbedaan kadar IL-1 yang signifikan secara statistik antarkelompok perlakuan. Selanjutnya, uji lanjutan dilakukan menggunakan *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan signifikan antar pasangan kelompok

Berdasarkan hasil perbandingan antar dua kelompok, validasi model kerusakan UVB terbukti kuat pada perbandingan K1 dengan K2, yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,0048$). Efek protektif dari perlakuan juga sangat jelas terlihat. Perbandingan K2 dengan K3 (*Niacinamide*) dan K2 dengan K4 (*Centella 5%*) keduanya menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($p<0,0001$).

Sebaliknya, pasangan kelompok yang tidak berbeda signifikan secara statistik secara konsisten menunjukkan p-value yang tinggi. Perbandingan antara K3 dengan K4 tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,9900$). Perbandingan antara kelompok sehat (K1) dengan kelompok perlakuan efektif K1 vs K3 ($p=0,2895$) dan K1 vs K4 ($p=0,1334$) juga tidak menunjukkan perbedaan signifikan.

Analisis pada efektivitas dosis 10% (K5) memberikan wawasan penting. Perbandingan K2 vs K5 tidak signifikan secara statistik ($p=0,1985$). Selain itu, perbandingan antara K1 dan K5 juga tidak signifikan ($p=0,3952$). Temuan mengenai respons bifasik diperkuat oleh analisis gabungan ini, di mana perbedaan antara K3 vs K5 ($p=0,0081$) dan K4 vs K5 ($p=0,0029$) keduanya sangat signifikan secara statistik, menunjukkan bahwa efektivitas dosis 5% secara kuantitatif jauh lebih unggul daripada dosis 10%.



Gambar 5.2. Grafik rata-rata kadar IL-1 setiap kelompok perlakuan

Diagram batang rerata kadar IL-1 (Gambar 5.2) menunjukkan bahwa kadar IL-1 pada jaringan kulit tikus bervariasi sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Hubungan yang bersifat signifikan ditandai melalui garis kurung (*bracket*) yang menghubungkan

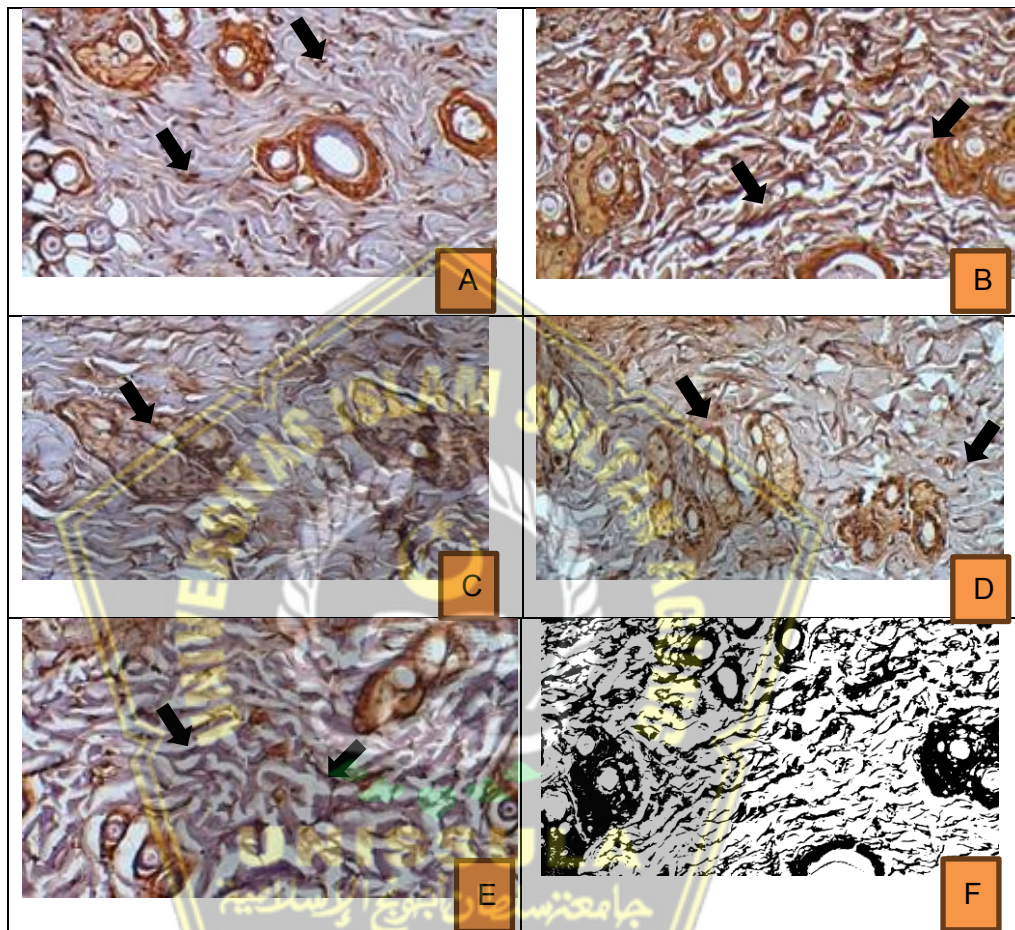
pasangan kelompok yang dibandingkan. Seperti yang terlihat pada gambar, perbedaan yang mencapai signifikansi statistik terdeteksi antara kelompok K1 dan K2, K2 dan K3, K2 dan K4, serta K2 dan K5.

5.1.3. Hasil analisis ekspresi COL3 jaringan kulit pada tiap kelompok

Untuk mengamati dampak perlakuan secara visual, dilakukan analisis kualitatif terhadap ekspresi Kolagen Tipe III (COL3) melalui pewarnaan Imunohistokimia (IHC). Gambaran histopatologi yang representatif dari jaringan kulit setiap kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 5.3. Secara visual, kelompok sehat (K1) menunjukkan ekspresi COL3 yang minimal. Kelompok kontrol (K2) yang terpapar UVB tampak memiliki area ekspresi positif (berwarna coklat) yang jauh lebih ekstensif dibandingkan dengan kelompok K1. Sementara itu, kelompok yang mendapat perlakuan *Niacinamide* (K3) dan *Centella asiatica* dosis 5% (K4) serta 10% (K5) menunjukkan area ekspresi positif yang tampak lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok K2., yang mengindikasikan adanya efek protektif dari perlakuan tersebut.

Di antara kelompok perlakuan, ekspresi pada kelompok *Niacinamide* (K3) dan *Centella asiatica* 10% (K5) tampak paling minimal, mendekati kondisi pada kelompok sehat (K1). Kelompok *Centella asiatica* 5% (K4) juga menunjukkan penekanan ekspresi yang jelas, meskipun secara visual area positifnya tampak sedikit

lebih banyak dibandingkan K3 dan K5. Temuan kualitatif ini selanjutnya dikonfirmasi melalui analisis kuantitatif untuk mendapatkan data persentase area yang objektif.



Gambar 5.3. Gambaran Histopatologi Ekspresi COL3 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). (F) Contoh gambar representasi K2 yang telah melalui proses tresholding dan siap melalui skoring area hitam/area putih x 100%

Hasil analisis rata-rata (kuantitatif) yang mengkonfirmasi temuan visual di atas menunjukkan bahwa kelompok tikus sehat tanpa perlakuan (K1) memiliki ekspresi COL3 sebesar $14,99 \pm 10,13\%$. Kelompok tikus yang diberikan krim vehikulum dan dipapar UVB (K2) menunjukkan

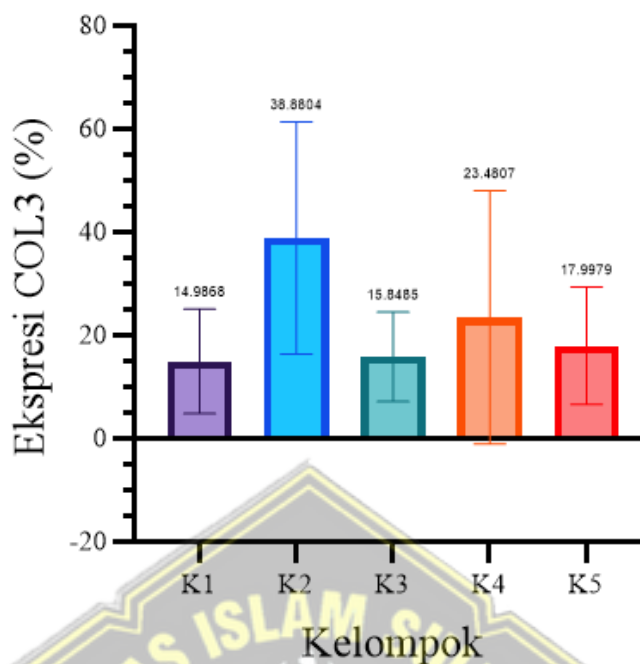
ekspresi COL3 yang lebih tinggi, yaitu sebesar $38,88 \pm 22,53\%$. Pada kelompok yang diberikan krim *Niacinamide* 5% (K3), ekspresi COL3 tercatat sebesar $15,85 \pm 8,653\%$. Kelompok yang diberikan krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 5% (K4) menunjukkan ekspresi COL3 sebesar $23,48 \pm 24,55\%$. Pada kelompok yang diberikan krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% (K5), ekspresi COL3 sebesar $18,00 \pm 11,35\%$.

Tabel 5.2. Hasil analisis statistik rerata ekspresi COL3

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi COL3 (%)						
Mean	14,99	38,88	15,85	23,48	18,00	
SD	$\pm 10,13$	$\pm 22,53$	$\pm 8,65$	$\pm 24,55$	$\pm 11,35$	
Shapiro-Wilk	0,9978	0,8315	0,6999	0,0292*	0,9944	
Levene Test						0.55936
Kruskal-Wallis						0,4568
Keterangan: Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)						
Levene Test : Homogen ($p > 0,05$)						
Kruskal-Wallis : Signifikan ($p < 0,05$)						

Hasil rata-rata ekspresi Kolagen Tipe III dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, dan diperoleh bahwa tidak semua kelompok memiliki distribusi data yang normal (Kelompok K4, $p=0,0292$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan *Levene Test* menunjukkan nilai $p = 0.55936$ ($p > 0,05$), yang berarti data memiliki variasi yang homogen. Karena asumsi normalitas tidak terpenuhi, maka dilakukan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan antarkelompok perlakuan. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan secara statistik di antara semua kelompok

($p=0,4568$), sehingga uji *post-hoc* untuk signifikansi tidak dilakukan. Kelompok tikus sehat (K1) memiliki rerata ekspresi COL3 sebesar $14,99 \pm 10,13\%$, sementara kelompok yang diberi krim vehikulum dan dipapar UVB (K2) menunjukkan ekspresi yang jauh lebih tinggi sebesar $38,88 \pm 22,53\%$. Efek protektif dari perlakuan terlihat jelas saat dibandingkan dengan kelompok K2. Kelompok yang diberikan krim *Niacinamide* 5% (K3) menunjukkan ekspresi COL3 sebesar $15,85 \pm 8,653\%$. Demikian pula, kelompok dengan pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* dosis 10% (K5) menunjukkan ekspresi yang rendah, yaitu $18,00 \pm 11,35\%$. Kelompok *Centella asiatica* 5% (K4) juga menunjukkan ekspresi COL3 yang rendah dibandingkan K2. Perbandingan dengan kondisi sehat (K1) menunjukkan bahwa perlakuan berhasil menormalkan ekspresi. Rerata ekspresi pada ketiga kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) tampak tidak berbeda jauh dari kondisi kulit sehat. Terakhir, perbandingan langsung antar kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) juga diamati. Diagram batang rerata ekspresi COL3 (Gambar 5.4) menunjukkan bahwa ekspresi COL3 pada jaringan kulit tikus bervariasi sesuai dengan perlakuan yang diberikan.



Gambar 5.4. Grafik rata-rata ekspresi COL3 setiap kelompok perlakuan

5.2. Pembahasan

Penelitian ini mengonfirmasi bahwa paparan sinar UVB merupakan inisiator kuat respons inflamasi kulit. Perbandingan antara kelompok sehat (K1) dan kelompok kontrol UVB (K2) menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p=0,0048$). Sesuai dengan penelitian dermatologi fotoaging oleh Ansary *et al.* tahun 2021 bahwa radiasi UVB secara cepat menginduksi peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-1, melalui aktivasi jalur NF- κ B dan p38 MAPK ¹²¹. Keberhasilan induksi inflamasi pada kelompok K2 ini mengkonfirmasi bahwa model kerusakan yang digunakan dalam penelitian telah berhasil.

Efek protektif dari perlakuan terlihat jelas. Baik *Niacinamide* 5% (K3) maupun *Centella asiatica* 5% (K4) menunjukkan kemampuan untuk menekan kadar IL-1 secara signifikan ($p<0,0001$) dibandingkan dengan

kelompok kontrol UVB (K2). Sesuai dengan penelitian farmakologi kulit oleh Hakozaiki *et al.* tahun 2002 bahwa kemampuan *Niacinamide* sebagai agen anti-inflamasi telah banyak dibuktikan, di mana ia berperan dalam memperkuat lapisan pelindung kulit dan menghambat perpindahan kantung pigmen kulit¹²². Temuan yang lebih penting adalah bahwa efektivitas *Centella asiatica* 5% (K4) terbukti sebanding dengan *Niacinamide* 5% (K3), yang ditunjukkan oleh tidak adanya perbedaan signifikan antar kedua kelompok tersebut ($p=0,9900$). Sesuai dengan penelitian fitoterapi oleh K. S. Park tahun 2021 bahwa ekstrak *Centella asiatica* pada konsentrasi 5% memiliki potensi anti-inflamasi setara standar terapi melalui kerja senyawa triterpenoid seperti asiaticoside dan madecassoside⁵⁸.

Temuan yang paling menarik dari penelitian ini adalah respons yang teramati pada kelompok dosis 10% (K5). Berbeda dengan dosis 5%, perlakuan *Centella asiatica* 10% (K5) secara statistik tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,1985$) dalam menekan IL-1 dibandingkan dengan kelompok kontrol UVB (K2). Lebih lanjut, efektivitasnya terbukti secara signifikan lebih inferior (kadar IL-1 lebih tinggi) dibandingkan dengan *Niacinamide* (K3) ($p=0,0081$) dan *Centella asiatica* 5% (K4) ($p=0,0029$).

Fenomena ini dengan kuat mengindikasikan adanya respons dosis bifasik atau hormesis (sebuah fenomena di mana dosis rendah memberikan efek positif, namun dosis yang lebih tinggi justru kehilangan efektivitasnya atau bahkan memberikan efek negatif), di mana peningkatan konsentrasi dari 5% menjadi 10% justru menyebabkan hilangnya efektivitas anti-

inflamasi. Sesuai dengan penelitian farmakologi herbal oleh Leanpolchareanchai & Teeranachaideekul tahun 2023 bahwa konsentrasi ekstrak herbal yang terlalu tinggi dapat bersifat iritan pada kulit, sehingga memicu respons inflamasi ringan yang menetralkan efek terapeutiknya¹²³. Sesuai dengan penelitian toksikologi dosis rendah oleh Calabrese & Baldwin tahun 2003 bahwa senyawa bioaktif dari tumbuhan menunjukkan kurva respons non-linier, di mana efek optimal tercapai pada konsentrasi menengah, dan efeknya menurun atau bahkan berbalik pada konsentrasi yang lebih tinggi akibat saturasi reseptor atau mekanisme umpan balik negatif¹²⁴.

Pada parameter ekspresi Kolagen Tipe III (COL3), analisis statistik non-parametrik (Kruskal-Wallis) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik di antara semua kelompok ($p=0,4568$). Secara statistik, hal ini berarti tidak ada cukup bukti untuk menolak hipotesis nol, dan perbedaan antar kelompok tidak dapat dikonfirmasi.

Namun, pemaknaan secara biologis tetap krusial. Pola yang terlihat secara visual menunjukkan akumulasi COL3 yang lebih ekstensif pada kelompok K2. Sesuai dengan penelitian penyembuhan luka oleh Stewart *et al.* tahun 2024 bahwa lonjakan COL3 bukan tanda perbaikan positif, melainkan respons perbaikan kompensatorik berupa matriks darurat (jaringan ikat awal yang terbentuk secara cepat dan tidak teratur sebagai respons paparan UVB) yang disintesis fibroblas pada fase proliferasi awal kerusakan parah¹²⁵. Sesuai dengan penelitian *photoaging* oleh Quan *et al.*

tahun 2009 bahwa paparan UVB kronis menginduksi gangguan regulasi matrix metalloproteinase (MMP), menyebabkan degradasi kolagen diikuti sintesis kolagen abnormal dalam proses *photoaging* dan penyembuhan luka. Sebaliknya, penurunan COL3 seperti pada kelompok perlakuan (K3, K4, K5) merupakan tanda normalisasi yaitu proses remodeling kembali mendekati level basal (K1) ¹²⁶.

Sesuai dengan penelitian metodologi imunohistokimia oleh Martinez-Morilla *et al.* tahun 2022 dan O'Hurley *et al.* tahun 2014 bahwa tidak signifikkannya hasil Kruskal-Wallis kemungkinan besar disebabkan oleh variabilitas data tinggi antar sampel yang merupakan hal umum pada kuantifikasi IHC sehingga meningkatkan risiko *Type II error* (atau *false negative*), yaitu sebuah kondisi di mana penelitian gagal mendeteksi perbedaan yang signifikan secara statistik padahal perbedaan tersebut mungkin secara biologis benar-benar ada ^{127,128}.. Meskipun demikian, tren kualitatif di mana kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) menunjukkan ekspresi COL3 yang tampak kembali mendekati level basal (K1) adalah temuan yang konsisten. Hal ini secara biologis masuk akal yaitu dibuktikan melalui penelitian regenerasi kulit oleh Mahmoud *et al.* tahun 2024 bahwa dengan berkurangnya inflamasi (IL-1) secara signifikan, sinyal untuk produksi matriks darurat secara berlebihan juga akan berkurang, sehingga memodulasi proses perbaikan ke arah yang lebih terkontrol ¹²⁹.

5.3. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu dipertimbangkan. Keterbatasan utama terletak pada kombinasi ukuran sampel yang kecil ($n=5$) dengan variabilitas data yang tinggi, terutama pada pengukuran IHC Kolagen Tipe III. Sesuai dengan penelitian metodologi imunohistokimia oleh O'Hurley *et al.* tahun 2014 bahwa ukuran sampel kecil dikombinasikan dengan variabilitas antar-sampel pada kuantifikasi IHC sering menyebabkan Type II error, di mana perbedaan biologis yang ada gagal terdeteksi secara statistik¹²⁸. Sesuai dengan penelitian analisis statistik biomedis oleh Button *et al.* tahun 2013 bahwa low statistical power akibat n kecil (<6 per kelompok) meningkatkan risiko false negative hingga $>70\%$ pada studi praklinis¹³⁰.

Selain itu, desain dosis yang hanya menggunakan dua konsentrasi (*Centella asiatica* 5% dan 10%) belum cukup untuk memetakan secara detail respons bifasik yang teramati pada parameter IL-1. Sesuai dengan penelitian farmakodinamik herbal oleh Agathokleous & Calabrese tahun 2020 bahwa pemetaan lengkap kurva respons bifasik/hormesis memerlukan minimal 5–6 titik dosis untuk mengidentifikasi *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL) dan *biphasic transition point*¹³¹.

Keterbatasan parameter mekanistik yang hanya mengukur IL-1 dan ekspresi COL3 juga belum memberikan gambaran utuh tentang kualitas remodeling matriks atau aktivasi jalur sinyal hulu. Sesuai dengan penelitian biologi kulit oleh Rittié & Fisher tahun 2005 bahwa evaluasi *photoaging*

yang komprehensif seharusnya mencakup penilaian MMP-1, TIMP-1, TGF- β , dan rasio COL1:COL3 untuk menilai kualitas matriks ekstraseluler ¹³².

Keterbatasan lain terletak pada formulasi krim standar yang digunakan, 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 bahan peningkat penyerapan atau sistem *nano-delivery* sering menghasilkan bioavailabilitas <20% pada kulit tikus, sehingga memengaruhi konsistensi efek terapeutik ¹³³.

Mekanisme biologis di balik respons bifasik yang teramati pada parameter IL-1, di mana dosis yang lebih tinggi menunjukkan efek anti-inflamasi yang lebih rendah, belum dapat dijelaskan secara mendalam melalui penelitian ini. Sesuai dengan review farmakologi herbal oleh Nisar *et al.* tahun 2023 bahwa efek pro-inflamasi pada dosis tinggi mungkin melibatkan aktivasi jalur alternatif seperti TLR4 atau iritasi lokal, namun memerlukan pengukuran biomarker tambahan (misalnya: TNF- α , COX-2, ROS) ¹³⁴.

Terakhir, penggunaan model hewan tikus Wistar dengan paparan sub-akut membatasi generalisasi langsung hasil ke kulit manusia dan proses *photoaging* kronis. Sesuai dengan penelitian translasi dermatologi oleh Bhattacharya *et al.* tahun 2013 bahwa perbedaan struktur kulit (epidermis lebih tipis, tidak ada *rete ridges*) dan pola paparan (akut vs kronis) pada

tikus mengurangi relevansi klinis dibandingkan model kulit manusia atau studi klinis fase I⁶⁵.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

3. Pada parameter kadar IL-1, pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* 5% secara topikal terbukti efektif sebagai agen anti-inflamasi poten, yang ditunjukkan dengan rendahnya kadar IL-1 secara signifikan dibandingkan dengan kontrol vehikulum. Sebaliknya, pemberian krim ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi 10% tidak menunjukkan efek pada kadar IL-1 yang bermakna secara statistik.
4. Pada parameter ekspresi COL3, krim ekstrak *Centella asiatica* 10% dan krim ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi 5% tidak menunjukkan adanya perubahan yang bermakna secara statistik pada ekspresi Kolagen Tipe III.

6.2. Saran

1. Untuk menjawab keterbatasan ukuran sampel dan variabilitas data, penelitian selanjutnya wajib menggunakan ukuran sampel yang lebih besar (dihitung menggunakan analisis kekuatan *a priori*) untuk memberikan kekuatan statistik yang cukup dalam mengonfirmasi tren yang teramati pada ekspresi Kolagen Tipe III. Penerapan teknologi penghantaran obat yang lebih modern, seperti nanoemulsi atau *liposomal delivery*, juga dapat dipertimbangkan untuk meningkatkan bioavailabilitas dan mengurangi variabilitas hasil.

2. Penelitian lanjutan harus mencakup rentang dosis yang lebih luas dan bertahap (misalnya sesuai referensi minimal 5 titik dosis yaitu 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%) untuk menentukan dosis optimal *Centella asiatica* dan untuk menjelaskan secara mendalam mekanisme biologis di balik respons bifasik yang teramati pada kadar IL-1.
3. Perlu dilakukan analisis terhadap parameter lain untuk mendapatkan gambaran mekanisme yang lebih holistik, seperti: mengukur rasio kolagen tipe I/III, rasio MMP1/TIMP1, menggunakan pewarnaan *Masson's Trichrome*, serta menganalisis kadar MMP-1, TIMP-1, TGF- β , (TNF- α , COX-2, dan ROS mengungkap apakah respons bifasik melibatkan aktivasi jalur alternatif seperti TLR4 atau iritasi lokal) pada setiap titik dosis.
4. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan dengan model paparan UVB kronis (8-12 minggu) untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak pada tanda *photoaging* permanen, yang kemudian dapat dilanjutkan ke tahap uji klinis pada subjek manusia untuk mengonfirmasi efektivitas dan keamanan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, Choi YJ, Fan M, Kim E kyung, *et al.* Inhibitory Effect of *Centella asiatica* Extract on DNCB-Induced Atopic Dermatitis in HaCaT Cells and BALB/c Mice. *Nutrients*. 2020 Feb 5;12(2):411.
2. Lin P, Shi HY, Lu YY, Lin J. *Centella asiatica* alleviates psoriasis through JAK/STAT3-mediated inflammation: An in vitro and in vivo study. *J Ethnopharmacol*. 2023 Dec 5;317:116746.
3. Choi MJ, Zheng HM, Kim JM, Lee KW, Park YH, Lee DH. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Mol Med Rep*. 2016 Nov;14(5):4521–8.
4. Fernando Venesia N, Fachrial E, Nyoman I, Lister E. Effectiveness Test of *Centella asiatica* Extract on Improvement of Collagen and Hydration in Female White Rat (*Rattus Norvegicus* Wistar). *Technology, and Sciences (ASRJETS) American Scientific Research Journal for Engineering [Internet]*. 2020;65(1):98–107. Available from: <http://asrjetsjournal.org/>
5. Linda Yulianti Wijayadi, Mardiyati E, Bramono K, Freisleben HJ. Asiaticoside induces cell proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Univ Med [Internet]*. 2015;34(2):96–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.18051/UnivMed.2015.v34.96-103>
6. Boraschi D. What Is IL-1 for? The Functions of Interleukin-1 Across Evolution. *Front Immunol*. 2022 Apr 6;13.
7. Zhu Z, Wang D, Jiao W, Chen G, Cao Y, Zhang Q, *et al.* Bioinformatics analyses of pathways and gene predictions in IL-1 α and IL-1 β knockout mice with spinal cord injury. *Acta Histochem*. 2017 Sep;119(7):663–70.
8. Chen W, Bowden GT. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. 1999;18(52):7469–76.
9. Bachelor MA, Cooper SJ, Sikorski ET, Bowden GT. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Molecular Cancer Research [Internet]*. 2005;3(2):90–9. Available from: <https://mcr.aacrjournals.org/content/molcanres/3/2/90.full.pdf>
10. Cooper SJ, MacGowan J, Ranger-Moore J, Young MR, Colburn NH, Bowden GT. Expression of dominant negative c-jun inhibits ultraviolet B-

induced squamous cell carcinoma number and size in an SKH-1 hairless mouse model. *Molecular Cancer Research* [Internet]. 2003;1(11):848–54. Available from: <https://mcr.aacrjournals.org/content/molcanres/1/11/848.full.pdf>

11. Huang C, Ma WY, Dong Z. The extracellular-signal-regulated protein kinases (Erks) are required for UV-induced AP-1 activation in JB6 cells. *Oncogene*. 1999;18(18):2828–35.
12. Cheema U, Mudera V. Collagen-Based Systems to Mimic the Extracellular Environment. *Multifunctional Hydrogels for Biomedical Applications*. 2022. 23–36 p.
13. Deshmukh SN, Dive AM, Moharil R, Munde P. Enigmatic insight into collagen. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016;20(2):276–83.
14. Shahrajabian MH, Sun W. Mechanism of Action of Collagen and Epidermal Growth Factor: A Review on Theory and Research Methods. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2024;24(4):453–77.
15. Ivanov SV, Bauer R, Pokidysheva EN, Boudko SP. Collagen IV Exploits a Cl- Step Gradient for Scaffold Assembly. Vol. 21, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021. 129–141 p.
16. Stewart DC, Brisson BK, Yen WK, Liu Y, Wang C, Ruthel G, *et al*. Type III Collagen Regulates Matrix Architecture and Mechanosensing during Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2024 Sep;
17. Singh D, Rai V, K Agrawal D. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med*. 2023;07(01).
18. McCabe MC, Hill RC, Calderone K, Cui Y, Yan Y, Quan T, *et al*. Alterations in extracellular matrix composition during aging and *photoaging* of the skin. *Matrix Biol Plus*. 2020 Nov;8:100041.
19. Lin Y, Cao Z, Lyu T, Kong T, Zhang Q, Wu K, *et al*. Single-cell RNA-seq of UVB-radiated skin reveals landscape of *photoaging*-related inflammation and protection by vitamin D. *Gene*. 2022 Jul;831:146563.
20. Feng C, Chen X, Yin X, Jiang Y, Zhao C. Matrix Metalloproteinases on Skin *Photoaging*. *J Cosmet Dermatol*. 2024 Dec 4;23(12):3847–62.
21. Reuben PM. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) gene expression by protein kinases. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11(1):1199.

22. Chen YY, Yan XJ, Jiang XH, Lu FL, Yang XR, Li DP. Vicenin 3 ameliorates ECM degradation by regulating the MAPK pathway in SW1353 chondrocytes. *Exp Ther Med*. 2021 Oct 20;22(6):1461.
23. Ciężyńska M, Bednarski IA, Wódz K, Narbutt J, Sobjanek M, Woźniacka A, *et al*. Impact of Ultraviolet Radiation on Expression of Transforming Growth Factor β , Smad2, Metalloproteinases-1, -3, -8, -9, Cathepsin K and Progerin. *Photochem Photobiol*. 2018 Mar 19;94(2):362–9.
24. Edgar S, Hopley B, Genovese L, Sibilla S, Laight D, Shute J. Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep*. 2018 Jul 11;8(1):10474.
25. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013;30(1):46–9.
26. Ganie IB, Ahmad Z, Shahzad A, Zaushintsena A, Neverova O, Ivanova S, *et al*. Biotechnological Intervention and Secondary Metabolite Production in *Centella asiatica* L. *Plants*. 2022;11(21).
27. Sun B, Wu L, Wu Y, Zhang C, Qin L, Hayashi M, *et al*. Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Front Pharmacol*. 2020;11.
28. Sarumathi A, Manjula S, Saravanan N. Health benefits of *Centella asiatica* (L) on the brain. *Food and Brain Health*. 2014. 85–96 p.
29. Thakurdesai PA. *Centella asiatica* (Gotu kola) leaves: Potential in neuropsychiatric conditions. *Nutraceuticals in Brain Health and Beyond*. 2020. 307–328 p.
30. Choi MJ, Zheng HM, Kim JM, Lee KW, Park YH, Lee DH. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Mol Med Rep*. 2016;14(5):4521–8.
31. Yan ZH, Shi XY, Jiang H. Phytochemistry, Pharmacology, and Clinical Applications of *Centella asiatica* (L.) Urban. *World J Tradit Chin Med*. 2023;9(4):369–98.
32. Gray NE, Alcazar Magana A, Lak P, Wright KM, Quinn J, Stevens JF, *et al*. *Centella asiatica*: phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochemistry Reviews*. 2018;17(1):161–94.
33. Razali NNM, Ng CT, Fong LY. Cardiovascular Protective Effects of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Planta Med*. 2019;85(16):1203–15.

34. Srivastava S, Tiwari S, Srivastava N, Verma S, Rawat AKS. Chemotaxonomic Studies on *Centella asiatica* (L.) Urb. from Varied Phytogeographical Conditions of India for Its Industrial Prospection. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences. 2019;89(3):1057–66.
35. Saansoomchai P, Limmongkon A, Surangkul D, Chewonarin T, Srikummool M. Enhanced VEGF expression in hair follicle dermal papilla cells by *Centella asiatica* linn. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences. 2018;17(1):25–37.
36. Mahato SB, Sahu NP, Luger P, Müller E. Stereochemistry of a triterpenoid trisaccharide from *Centella asiatica*. X-Ray determination of the structure of asiaticoside. J Chem Soc, Perkin Trans 2. 1987;(10):1509–15.
37. Bandopadhyay S, Mandal S, Ghorai M, Jha NK, Kumar M, Radha, *et al.* Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review. J Cell Mol Med. 2023 Mar 8;27(5):593–608.
38. 孟艳秋. Research Progress on Pharmacological Effects of Asiatic Acid and Its Derivatives. Studies in Synthetic Chemistry. 2015;03(04):75–83.
39. Valdeira ASC, Ritt DA, Morrison DK, McMahon JB, Gustafson KR, Salvador JAR. Synthesis and Biological Evaluation of New Madecassic Acid Derivatives Targeting ERK Cascade Signaling. Front Chem. 2018 Sep 28;6.
40. Han X, Zhao J, Zhou H, Zhou X, Deng Z, Liu Z, *et al.* The biosynthesis of asiaticoside and madecassoside reveals tandem duplication–directed evolution of glycoside glycosyltransferases in the Apiales. Plant Commun. 2024 Oct;5(10):101005.
41. Lv J, Sharma A, Zhang T, Wu Y, Ding X. Pharmacological Review on Asiatic Acid and Its Derivatives: A Potential Compound. SLAS Technol. 2018 Apr;23(2):111–27.
42. Hu X, Chen M, Nawaz J, Duan X. Regulatory Mechanisms of Natural Active Ingredients and Compounds on Keratinocytes and Fibroblasts in Mitigating Skin *Photoaging*. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2024 Aug;Volume 17:1943–62.
43. Setiawati A, Maharani BA, Sari PAP, Wyantara KA, Saputra BW, Febriansyah R, *et al.* Deciphering the molecular pathway of an asiaticoside-rich fraction of *Centella asiatica* as an anti-melanogenesis agent. Journal of HerbMed Pharmacology. 2024;13(2):269–79.

44. Tan SC, Bhattamisra SK, Chellappan DK, Candasamy M. Actions and Therapeutic Potential of Madecassoside and Other Major Constituents of *Centella asiatica*: A Review. *Applied Sciences*. 2021 Sep 13;11(18):8475.
45. Orlova S V., Prokopenko E V., Nikitina EA, Batysheva TT, Balashova N V., Alekseeva M V., *et al.* The role of natural antioxidants and enzyme inhibitors in the prevention of skin aging. *Medical alphabet*. 2024 Sep 4;(16):8–12.
46. Mushtaq Z, Imran M, Hussain M, Saeed F, Imran A, Umar M, *et al.* Asiatic acid: a review on its polypharmacological properties and therapeutic potential against various Maladies. *Int J Food Prop*. 2023 Sep 22;26(1):1244–63.
47. Liu Y, Zhao J, Mu X, Deng J, Wu X, He W, *et al.* Asiaticoside-nitric oxide promoting diabetic wound healing through the miRNA-21-5p/TGF- β 1/SMAD7/TIMP3 signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2024;319.
48. Park JH, Choi JY, Son DJ, Park EK, Song MJ, Hellström M, *et al.* Anti-inflammatory effect of titrated extract of *Centella asiatica* in phthalic anhydride-induced allergic dermatitis animal model. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
49. 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.
50. 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).
51. 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.
52. Kim M, Lee S, Heo H, Chung JW, Sung J, Jeong HS, *et al.* Synergistic Protective Effect of *Agastache rugosa* and *Centella asiatica* against UVB-Induced Damage in Human Skin Fibroblasts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2022;51(7):671–8.
53. Retnaningtyas E, Susatia B, Khotimah H, Rudijanto A, Ali Ahmed Abousouh A, Setiawan A. *Centella asiatica* transfersomes and Bergamot essential oil nanoemulsion combined in gel exhibited anti-photoaging effects on UVB-radiated BALB/c mice. *J King Saud Univ Sci*. 2024;36(6).

54. Lim J, Lee H, Hong S, Lee J, Kim Y. Comparison of the Antioxidant Potency of Four Triterpenes of *Centella asiatica* against Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2024;13(4).
55. Maramaldi G, Togni S, Franceschi F, Lati E. Anti-inflammaging and antiglycation activity of a novel botanical ingredient from African biodiversity (CentevitaTM). *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2013;7.
56. Buranasudja V, Rani D, Malla A, Kobtrakul K, Vimolmangkang S. Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Sci Rep*. 2021;11(1).
57. Kongkaew C, Meesomperm P, Scholfield CN, Chaiwiang N, Waranuch N. Efficacy and Safety of *Centella asiatica* (L.) Urb. on Wrinkles: A Systematic Review of Published Data and Network Meta-Analysis. *J Cosmet Sci*. 2020;71(6):439–54.
58. Park KS. Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021.
59. Pedić L, Pondeljak N, Šitum M. Recent information on *photoaging* mechanisms and the preventive role of topical sunscreen products. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2020;25(4):201–7.
60. Kim ES, Kang C. Consider using a broad-spectrum sunscreen daily to prevent *photoaging*. *Drugs and Therapy Perspectives*. 2022;38(6):268–73.
61. Etzel RA. Ultraviolet Light: A Hazard to Children. *Pediatrics*. 1999 Aug 1;104(2):328–33.
62. Cavinato M, Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for *photoaging* of the human skin. *Exp Gerontol*. 2017;94:78–82.
63. Mayangsari E, Mustika A, Nurdiana N, Samad NA. Comparison of UVA vs UVB *Photoaging* Rat Models in Short-term Exposure. *Medical Archives*. 2024;78(2):88–91.
64. Christensen L, Suggs A, Baron E. Ultraviolet Photobiology in Dermatology. In 2017. p. 89–104.
65. Bhattacharyya TK, Barch BE, Vargas M, Thomas JR. Cutaneous injury following acute UV-B radiation in a mouse model: A pilot histological study. *J Histotechnol*. 2013;36(2):37–44.

66. Imokawa G. The Xanthophyll Carotenoid Astaxanthin has Distinct Biological Effects to Prevent the *Photoaging* of the Skin Even by its Postirradiation Treatment. *Photochem Photobiol.* 2019;95(2):490–500.
67. Black AT. Ultraviolet B (UVB). Vol. 9, *Encyclopedia of Toxicology*, Fourth Edition: Volume 1-9. 2023. V9-655-V9-661 p.
68. Subedi L, Lee TH, Wahedi HM, Baek SH, Kim SY. Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
69. Chaiprasongsuk A, Lohakul J, Soontrapa K, Sampattavanich S, Akarasereenont P, Panich U. Activation of Nrf2 reduces UVA-mediated MMP-1 upregulation via MAPK/AP-1 signaling cascades: The photoprotective effects of sulforaphane and hispidulins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2017;360(3):388–98.
70. Xiao X, Huang M, Fan C, Zuo F. Research on the senescence of human skin fibroblasts induced by ultraviolet b and its mechanism. *Biomedical Research (India).* 2018;29(2):313–6.
71. Park JY, Lee JY, Kim Y, Kang CH. *Latilactobacillus sakei* Wikim0066 Protects Skin through MMP Regulation on UVB-Irradiated In Vitro and In Vivo Model. *Nutrients.* 2023;15(3).
72. Park JY, Lee JY, Kim Y, Kang CH. Lactic Acid Bacteria Improve the Photoprotective Effect via MAPK/AP-1/MMP Signaling Pathway on Skin Fibroblasts. *Microorganisms.* 2022;10(12).
73. Oh JH, Karadeniz F, Lee JI, Seo Y, Kong CS. *Oleracone C* from *Portulaca oleracea* attenuates UVB-induced changes in matrix metalloproteinase and type I procollagen production via MAPK and TGF- β /Smad pathways in human keratinocytes. *Int J Cosmet Sci.* 2023;45(2):166–76.
74. Tang X, Yang T, Yu D, Xiong H, Zhang S. Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: Friends and foes to the skin and beyond the skin. *Environ Int.* 2024 Mar;185:108535.
75. Bang JS, Choung SY. Inhibitory effect of oyster hydrolysate on wrinkle formation against UVB irradiation in human dermal fibroblast via MAPK/AP-1 and TGF β /Smad pathway. *J Photochem Photobiol B.* 2020;209.
76. Song B, Liu D, Liu TC, Li K, Wang S, Liu J, *et al.* The combined effect of commercial tilapia collagen peptides and antioxidants against UV-induced skin *photoaging* in mice. *Food Funct.* 2023;14(13):5936–48.

77. Zawrotniak M, Bartnicka D, Rapala-Kozik M. UVA and UVB radiation induce the formation of neutrophil extracellular traps by human polymorphonuclear cells. *J Photochem Photobiol B*. 2019;196.
78. Sun W, Liao Y, Yi Q, Wu S, Tang L, Tong L. The Mechanism of <scp>CIRP</scp> in Regulation of <scp>STAT</scp> 3 Phosphorylation and Bag-1/S Expression Upon <scp>UVB</scp> Radiation. *Photochem Photobiol*. 2018 Nov 8;94(6):1234–9.
79. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez J, Juarranz A, Devmurari A, Chalensouk-Khaosaat J, *et al*. Mechanisms of *Photoaging* and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants*. 2015 Mar 26;4(2):248–68.
80. Barnes TM, Mijaljica D, Townley JP, Spada F, Harrison IP. Vehicles for Drug Delivery and Cosmetic Moisturizers: Review and Comparison. *Pharmaceutics*. 2021 Nov 26;13(12):2012.
81. Ahmadi D, Mahmoudi N, Li P, Tellam J, Barlow D, Lawrence MJ. Simple Creams, Complex Structures. In: ACS Symposium Series. American Chemical Society; 2020. p. 77–94.
82. Osborne DW, Dahl K, Parikh H. Determination of Particle Size and Microstructure in Topical Pharmaceuticals. In 2019. p. 89–106.
83. K. Nunse D, N. Jadhav R, S. Deshmukh A. Cream as a Drug Delivery System for Topical Diseases. *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences*. 2022 Jun 30;35–43.
84. Franco-Gil ME, Graça A, Martins A, Marto J, Ribeiro HM. Emollients in dermatological creams: Early evaluation for tailoring formulation and therapeutic performance. *Int J Pharm*. 2024 Mar;653:123825.
85. Chauhan L, Gupta S. Creams: A Review on Classification, Preparation Methods, Evaluation and its Applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020 Oct 15;10(5-s):281–9.
86. Nwosu A, Eke-Ejiofor J. Quality Parameters of Salad Cream from Four Local Varieties of Millet Starches in Nigeria. *American Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2021 Jul 6;3(1):10–20.
87. Joshi S, Vaghela K, Patel D, Soni H, Zaveri M. A detailed quality control assessment of polyherbal pain reliever cream. *Int J Herb Med*. 2023 May 1;11(3):38–45.

88. Vogel EM, Marques LLM, Droval AA, Gozzo AM, Cardoso FAR. Quality of cosmetics with active caffeine in cream and gel galenic bases prepared by compounding pharmacies. *Brazilian Journal of Biology*. 2022;82.
89. Bae JP, Lee KM, f F, Park JW, Park JH, Kang TJ. Study for Anti-inflammatory Effects of *Centella asiatica* Extract Powder. *Yaghag hoeji*. 2023;
90. Afif Z, Santoso MIE, Nurdiana .., Khotimah H, Satriotomo I, Kurniawan SN, *et al.* Effect of *Centella asiatica* ethanol extract on zebrafish larvae (*Danio rerio*) insomnia model through inhibition of Orexin, ERK, Akt and p38. *F1000Res*. 2024;
91. Eom HJ, Shin HY, Park HJ, Kim KH, Kim JH, Yu KW. Functional components and physiological activity in different parts of *Centella asiatica*. *Korean Journal of Food Preservation* [Internet]. 2022;29(5):749–61. Available from: http://www.ekosfop.or.kr/download/download_pdf?pid=kjfp-29-5-749
92. Khotimah H, Setiawan A, Rita CI, Mardiyah M, Ali A, Sukatman MP, *et al.* In silico studies of natural compounds of *Centella asiatica* as anti-aging and wound healing agents. In 2021.
93. Kee MS, Son JH, Sewon M, Chan KB, Sun KC, Mi CS, *et al.* *Centella asiatica* aseptic aging solution with the skin calming and repair effects using a mineral and its Preparation method. 2020.
94. Nema NK, Maity N, Sarkar BK, Mukherjee PK. Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of *Centella asiatica*. *Pharm Biol*. 2013 Sep 13;51(9):1182–7.
95. Lee J, Jung E, Kim Y, Park J, Park J, Hong S, *et al.* Asiaticoside Induces Human Collagen I Synthesis through TGF β Receptor I Kinase (T β RI Kinase)-Independent Smad Signaling. *Planta Med*. 2006 Jan;72(4):324–8.
96. Yuliati L, Mardliyati E, Bramono K, Freisleben HJ. Asiaticoside induces cell proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Universa Medicina*. 2015 Dec 15;34(2):96.
97. 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.
98. Chen AC, Damian DL. Nicotinamide and the skin. *Australasian Journal of Dermatology*. 2014 Aug 17;55(3):169–75.

99. Kim HM, Byun KA, Oh S, Yang JY, Park HJ, Chung MS, *et al.* A Mixture of Topical Forms of Polydeoxyribonucleotide, Vitamin C, and *Niacinamide* Attenuated Skin Pigmentation and Increased Skin Elasticity by Modulating Nuclear Factor Erythroid 2-like 2. *Molecules*. 2022 Feb 14;27(4):1276.
100. Marques C, Hadjab F, Porcello A, Lourenço K, Scaletta C, Abdel-Sayed P, *et al.* Mechanistic Insights into the Multiple Functions of *Niacinamide*: Therapeutic Implications and Cosmeceutical Applications in Functional Skincare Products. *Antioxidants*. 2024 Mar 30;13(4):425.
101. Surjana D, Halliday GM, Damian DL. Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *J Nucleic Acids*. 2010 Jan 25;2010(1).
102. Sari N, Samsul E, Narsa AC. Pengaruh Trietanolamin pada Basis Krim Minyak dalam Air yang Berbahan Dasar Asam Stearat dan Setil Alkohol. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. 2021 Dec 31;14:70–5.
103. Pivsa-Art W, Siraworakun C, Pivsa-Art S. Improvement of water cooling system for oil in water cosmetic cream production process. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 2019;52(10):789–92.
104. Rahmawati YD, Aulanni'am A, Prasetyawan S. Effects of Oral and Topical Application of *Centella asiatica* Extracts on the UVB-Induced *Photoaging* of Hairless Rats. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*. 2019;
105. Ratz-Łyko A, Arct J, Pytkowska K. Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing *Centella asiatica* Extract. *Indian J Pharm Sci*. 2016;
106. 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.
107. 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.
108. 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.

109. 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.
110. Arsita C, Nasihun T, Husaana A. UVB Dose Optimization for Phototherapy in Vitamin D Deficiency: Profile Analysis of Vitamin D, TNF- α , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Platelet Derived Growth Factor (PDGF) in Wistar Rats. Bangladesh Journal of Medical Science. 2020 Apr 12;19(4):749–54.
111. Krismayogi GA, Ratnayanti ID, Linawati NM, Wiryawan IS, Sugiritama IW, Wahyuniari IAI, *et al.* Purple Cabbage Extract Cream Effect on Erythema Score of Male Wistar Rats Back Skin Exposed to UV-B Radiation. Biomedical and Pharmacology Journal. 2018 Mar 28;11(1):343–51.
112. Vijayaraj P. Immunohistochemistry Analysis Using Chromogenic Substrates on Tissue Sections. In 2022. p. 1–16.
113. Kohale MG, Dhobale A V., Bankar NJ, Noman O, Hatgaonkar K, Mishra V. Immunohistochemistry in pathology: A review. J Cell Biotechnol. 2023 Dec 7;9(2):131–8.
114. Salvi M, Michielli N, Salamone L, Mogetta A, Gambella A, Molinaro L, *et al.* Computational Synthesis of Histological Stains: A Step Toward Virtual Enhanced Digital Pathology. Int J Imaging Syst Technol. 2024 Sep 4;34(5).
115. Shojaeian S, Maslehat Lay N, Zarnani AH. Detection Systems in Immunohistochemistry. In: Immunohistochemistry - The Ageless Biotechnology. IntechOpen; 2020.
116. Johann DJ, Shin IJ, Roberge A, Laun S, Peterson EA, Liu M, *et al.* Effect of Antigen Retrieval on Genomic DNA From Immunodissected Samples. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2022 Sep 21;70(9):643–58.
117. Cizkova K, Flodrova P, Baranova R, Malohlava J, Lacey M, Tauber Z. Beneficial Effect of Heat-induced Antigen Retrieval in Immunocytochemical Detection of Intracellular Antigens in Alcohol-fixed Cell Samples. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 2020 Feb;28(2):166–74.
118. Guerin CJ. Using Antibodies in Microscopy: A Guide to Immunohistochemistry. Part 2: IHC Staining Protocols. Micros Today. 2023 May 31;31(3):34–9.

119. Oumarou Hama H, Aboudharam G, Barbieri R, Lepidi H, Drancourt M. Immunohistochemical diagnosis of human infectious diseases: a review. *Diagn Pathol*. 2022 Dec 30;17(1):17.
120. Liu Y, Keikhosravi A, Pehlke CA, Bredfeldt JS, Dutson M, Liu H, *et al*. Fibrillar Collagen Quantification With Curvelet Transform Based Computational Methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Apr 21;8.
121. Ansary TM, Hossain MdR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 12;22(8):3974.
122. Hakozaiki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, *et al*. The effect of *niacinamide* on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *British Journal of Dermatology*. 2002 Jul;147(1):20–31.
123. Leanpolchareanchai J, Teeranachaideekul V. Topical Microemulsions: Skin Irritation Potential and Anti-Inflammatory Effects of Herbal Substances. *Pharmaceuticals*. 2023 Jul 13;16(7):999.
124. Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003 Apr;43(1):175–97.
125. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of *photoaging*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015 Mar 25;31(2):65–74.
126. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-Degrading Metalloproteinases in *Photoaging*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2009 Aug;14(1):20–4.
127. Martinez-Morilla S, Moutafi M, Rimm DL. Standardization of PD-L1 immunohistochemistry. *Modern Pathology*. 2022 Mar;35(3):294–5.
128. 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.
129. Mahmoud NN, Hamad K, Al Shibitini A, Juma S, Sharifi S, Gould L, *et al*. Investigating Inflammatory Markers in Wound Healing: Understanding Implications and Identifying Artifacts. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2024 Jan 12;7(1):18–27.
130. Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, *et al*. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2013 May 10;14(5):365–76.

131. Agathokleous E, Calabrese EJ. Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. *Toxicology*. 2019 Sep;425:152249.
132. RITTIE L. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2002 Sep;1(4):705–20.
133. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*. 2017 Sep 21;9(4):37.
134. Nisar A, Jagtap S, Vyavahare S, Deshpande M, Harsulkar A, Ranjekar P, *et al*. Phytochemicals in the treatment of inflammation-associated diseases: the journey from preclinical trials to clinical practice. *Front Pharmacol*. 2023 May 9;14.

