

**PENGARUH PEMBERIAN AIR KELAPA MUDA SECARA ORAL  
TERHADAP KADAR MATRIX METALLOPROTEINASE-1  
(MMP-1) DAN KETEBALAN SERABUT KOLAGEN**

**(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang dipapar  
Sinar UVB)**

**Tesis**

**Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan Mencapai Derajat Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Melinda Angelin  
MBK 2424010514**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG  
2026**

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN AIR KELAPA MUDA SECARA ORAL  
TERHADAP KADAR MATRIX METALLOPROTEINASE-1  
(MMP-1) DAN KETEBALAN SERABUT KOLAGEN**

**(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang dipapar  
Sinar UVB)**

Disusun oleh :

Melinda Angelin  
MBK 2424010514

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE.,  
Subsp.DKE, FINSDV, FAADV,  
NIP : 130530279

Pembimbing II



Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikkah, SKM.,  
MKes.  
NIP : 210109119

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








Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes.  
NIP : 210198046

## LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis Dengan Judul : "Pengaruh Pemberian Air Kelapa Muda Secara Oral Terhadap Kadar *Matrix Metalloproteinase* (MMP-1) dan Ketebalan Serabut Kolagen (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang dipapar sinar UVB) ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada :

Hari : Selasa  
Tanggal : 20 Januari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE, Subsp. DKE, FINS DV, FAADV.	Pembimbing I	
2.	Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah SKM., M.Kes.	Pembimbing II	
3.	Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B	Penguji I	
4.	Prof. Dr. Atina Husaana, M.Si., APT.	Penguji II	
5.	Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes.	Penguji III	

## PERNYATAAN

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

Semarang, Januari 2026



Melinda Angelin  
MBK2424010514

## RIWAYAT HIDUP

### I. Identitas Diri

Nama : Melinda Angelin  
Tempat / tanggal lahir : Semarang, 27 Mei 1997  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Perempuan

### II. Riwayat Pendidikan Formal

1. SDN Dinoyo 01 Malang : Lulus tahun 2009
2. SMPN 06 Malang : Lulus tahun 2012
3. SMAN 01 Semarang : Lulus tahun 2015
4. S1 Kedokteran Umum UNISSULA : Lulus tahun 2019
5. Profesi Dokter UNISSULA : Lulus tahun 2021
6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2024 - Sekarang

### III. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua  
Ibu : Karmanis  
Ayah : Gurendi Wiwoho

## KATA PENGANTAR

*Assalammu 'alaikum warohmatullahi wabarakatuh*

Segala puji Kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa Allah SWT atas Rahmat dan karunia-Nya, sehingga tesis saya dapat terselesaikan dengan judul “Pengaruh Pemberian Air Kelapa Muda Secara Oral Terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase (MMP-1) dan Ketebalan Serabut Kolagen (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang dipapar sinar UVB)”.

Tesis ini di buat untuk memenuhi salah satu syarat dalam mendapatkan gelar Magister Biomedik pada program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.

Dengan demikian, penulis ingin menyampaikan terima kasih serta hormat kepada:

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto SH., M. Hum.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi SH., Sp.KF.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B.
4. Ibu Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE, Subsp. DKE, FINS DV, FAADV., sebagai pembimbing pertama, atas bimbingan, arahan, dan waktu yang telah diluangkan untuk berdiskusi selama bimbingan.

5. Ibu Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah SKM., M.Kes., sebagai pembimbing kedua, yang telah memberikan masukan, arahan serta meluangkan waktu untuk bimbingan.
6. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B. sebagai penguji satu saya, yang telah memberikan masukan, arahan serta meluangkan waktu untuk menguji dan membimbing.
7. Prof. Dr. Atina Husaana, M.Si., APt., sebagai penguji dua saya, yang telah memberikan masukan, arahan serta meluangkan waktu untuk menguji dan membimbing.
8. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes., sebagai penguji tiga saya, yang telah memberikan masukan, arahan serta meluangkan waktu untuk menguji dan membimbing.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan bimbingan dalam mempelajari ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Bapak kandung saya Gurendi Wiwoho; Ibu kandung saya Dr. Karmanis, M.Si.; Suami saya tercinta dr. Muhammad Faiz Haidar Rafi; Ketiga kakak saya Dr. drh. Aswin Rafif Khairullah, M.Si., Ainun Ganisia, S.Keb, M.Keb., dan dr. Melda Angelin, M.Biomed; Anak sholehah saya Syafira Mikhayla Annisa atas segala doa dan dukungan yang diberikan kepada saya.

Dengan segala keterbatasan pengalaman, ilmu, maupun referensi yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini terdapat kekurangan serta diperlukan pengembangan lebih lanjut. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan tesis ini serta sebagai masukan bagi penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa depan. Penulis berharap tesis ini dapat memberikan

manfaat bagi kita semua, terutama dalam pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

*Wassalammu 'alaikum warohmatullahi wabarakatuh*

Semarang, Januari 2026

Melinda Angelin



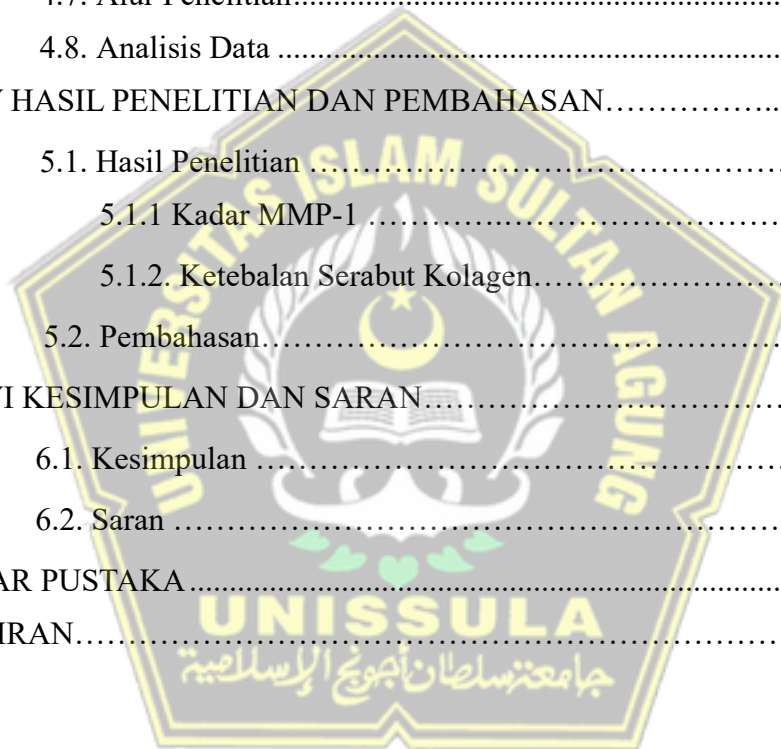
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	<b>Erro r! Bookmark not defined.</b>
PERNYATAAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan umum.....	4
1.3.2. Tujuan khusus.....	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	8
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	8
1.5.2. Manfaat Praktis.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Matrix Metalloproteinase.....	9
2.1.1. Definisi.....	9
2.1.2. Klasifikasi.....	10
2.1.3. Regulasi MMP-1 oleh ROS dan Sinar UV.....	12
2.1.4. Peran MMP-1 dalam Degradasi Kolagen.....	14

2.2. Kolagen.....	16
2.2.1. Pengertian dan Klasifikasi .....	16
2.2.2. Fungsi Kolagen.....	17
2.2.3. Sintesis dan Degradasi Kolagen .....	19
2.2.4. Regulasi Kolagen oleh ROS dan Sinar UVB .....	21
2.3. Air Kelapa Muda .....	23
2.3.1. Definisi Air Kelapa Muda .....	23
2.3.2. Komposisi Air Kelapa Muda.....	26
2.3.3. Kandungan dan Peranan Air Kelapa Muda .....	27
2.3.3.1 Vitamin C.....	27
2.3.3.2 L- Arginie .....	28
2.3.3.3 L-Methionine.....	29
2.3.3.4 Sitokinin .....	30
2.3.3.5 Selenium.....	31
2.3.3.6 Mineral (Magnesium, Seng, Mangan).....	31
2.3.3.7 L-Aspartic dan L-Glutamic Acid.....	32
2.3.3.8 L-Histidine dan L-Serine.....	33
2.3.3.9 Flavonoid.....	33
2.4. Sinar UV.....	34
2.4.1. Jenis Sinar UV .....	34
2.4.2. Mekanisme Penetrasi UVB Ke Dalam Kulit.....	36
2.4.3. Efek Biologis UVB.....	37
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.</b>	<b>40</b>
3.1 Kerangka Teori .....	40
3.2 Kerangka Konsep .....	44
3.3 Hipotesis.....	44
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>	<b>45</b>
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	45
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian.....	46

4.2.1. Populasi .....	46
4.2.2. Sampel .....	46
4.2.3. Teknik Sampling.....	47
4.2.3.1. Kriteria Inklusi.....	47
4.2.3.2. Drop Out .....	47
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	47
4.3.1. Variabel Penelitian.....	47
4.3.1.1. Variabel Bebas.....	47
4.3.1.2. Variabel Antara .....	47
4.3.1.3. Variabel Tergantung.....	47
4.3.2. Definisi Operasional .....	48
4.3.2.1 Air Kelapa Muda.....	48
4.3.2.2 Kadar MMP-1.....	48
4.3.2.3 Ketebalan Serabut Kolagen.....	48
4.4. Instrumen dan Bahan Penelitian .....	49
4.4.1. Instrumen Penelitian .....	49
4.4.2. Bahan Penelitian .....	50
4.5. Cara Penelitian.....	511
4.5.1. Adaptasi Hewan Coba .....	511
4.5.2. Perlakuan dan Pembagian Kelompok.....	52
4.5.3. Pemberian Air Kelapa Muda .....	52
4.5.4. Paparan Sinar UVB .....	53
4.5.5. Pemeriksaan Ketebalan Serabut Kolagen.....	53
4.5.5.1 Pengambilan Sampel Jaringan.....	53
4.5.5.2 Fiksasi .....	54
4.5.5.3 Proses Jaringan (Tissue Processing) .....	54
4.5.5.4 Embedding .....	54
4.5.5.5 Pematangan ( <i>Sectioning</i> ) .....	55

4.5.5.6	Pemanasan .....	55
4.5.5.7	Pewarnaan Kolagen ( <i>Masson's Trichrome</i> ) ..	55
4.5.5.8	Pemeriksaan Histologis .....	57
4.5.6.	Pemeriksaan Kadar MMP-1 .....	59
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian .....	60
4.6.1.	Tempat Penelitian .....	60
4.6.2.	Waktu Penelitian.....	61
4.7.	Alur Penelitian.....	62
4.8.	Analisis Data .....	62
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		64
5.1.	Hasil Penelitian .....	64
5.1.1	Kadar MMP-1 .....	65
5.1.2.	Ketebalan Serabut Kolagen.....	66
5.2.	Pembahasan.....	70
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....		77
6.1.	Kesimpulan .....	77
6.2.	Saran .....	77
DAFTAR PUSTAKA .....		79
LAMPIRAN.....		82



## DAFTAR SINGKATAN

<b>6-4 PPs</b>	: 6-4 Photoproducts
<b>AP-1</b>	: Activator Protein-1
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>COL1A1</b>	: Collagen Type I Alpha 1
<b>COL1A2</b>	: Collagen Type I Alpha 2
<b>COL3A1</b>	: Collagen Type III Alpha 1
<b>CPDs</b>	: Cyclobutane Pyrimidine Dimers
<b>DAMPs</b>	: Damage Associated Molecular Patterns
<b>ECM</b>	: Extracellular Matrix
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ERK</b>	: Extracellular Signal-Regulated Kinase
<b>GOx</b>	: Glucose Oxidase
<b>GPx</b>	: Glutathione Peroxidase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrogen Peroksida
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: Interleukin-1 Beta
<b>IL-6</b>	: Interleukin-6
<b>JNK</b>	: c-Jun N-terminal Kinase
<b>MAPK</b>	: Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MED</b>	: Minimal Erythema Dose
<b>MMP-1</b>	: Matrix Metalloproteinase 1
<b>MT-MMP</b>	: Membrane-Type Matrix Metalloproteinase
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nuclear Factor Kappa B
<b>NO</b>	: Nitric Oxide
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Superoxide
<b>•OH</b>	: Hydroxyl radical
<b>p38 MAPK</b>	: p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>ROS</b>	: Reactive Oxygen Species
<b>Smad</b>	: Small Mothers Against Decapentaplegic
<b>SOD</b>	: Superoxide Dismutase
<b>T<math>\beta</math>RI</b>	: Transforming Growth Factor Beta Receptor I
<b>T<math>\beta</math>RII</b>	: Transforming Growth Factor Beta Receptor II
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming Growth Factor Beta
<b>TIMP-1</b>	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tumor Necrosis Factor Alpha
<b>UVB</b>	: Ultraviolet B

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. UV terhadap Photoaging .....	14
Gambar 3.1. Kerangka Teori .....	44
Gambar 3.2. Kerangka Konsep .....	44
Gambar 4.1. Desain Penelitian.....	45
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	62
Gambar 5.1. Perbedaan Rerata Kadar MMP-1 Antar Kelompok.....	66
Gambar 5.2. Perbedaan Rerata Ketebalan Serabut Kolagen Antar Kelompok..	68
Gambar 5.3. Histopatologi ketebalan Serabut Kolagen Antar Kelompok.....	69



## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas penelitian .....	6
Tabel 2.1. Klasifikasi MMP .....	11
Tabel 2.2. Komposisi <i>Coconut Water Viridis Varieties</i> .....	26
Tabel 5.1. Hasil Analisis Kadar MMP-1 dan Ketebalan Serabut Kolagen.....	64
Tabel 5.2. Perbedaan Rerata Kadar MMP-1 Antar 2 Kelompok.....	66
Tabel 5.3. Perbedaan Rerata Ketebalan Serabut Kolagen Antar 2 Kelompok....	68



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Daftar Berat Badan dan Dosis Perlakuan Tiap Kelompok.....	82
Lampiran 2.	Nilai Kadar MMP-1 Tiap Kelompok.....	83
Lampiran 3.	Nilai Ketebalan Serabut Kolagen.....	84
Lampiran 4.	Hasil Pemeriksaan PA.....	85
Lampiran 5.	Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar MMP-1.....	87
Lampiran 6.	Uji <i>Kruskall Wallis</i> Kadar MMP-1.....	88
Lampiran 7.	Uji <i>Man Whitney</i> Kadar MMP-1.....	89
Lampiran 8.	Uji Normalitas dan Homogenitas Ketebalan Serabut Kolagen	92
Lampiran 9.	Uji <i>One Way Anova</i> Ketebalan Serabut Kolagen.....	92
Lampiran 10.	Uji <i>Post Hoc</i> Ketebalan Serabut Kolagen.....	93
Lampiran 11.	<i>Ethical Clearance</i> .....	93
Lampiran 12.	Surat Keterangan Penelitian.....	94
Lampiran 13.	Dokumentasi Penelitian.....	95



## ABSTRAK

**Latar belakang:** Paparan sinar ultraviolet B (UVB) berperan penting dalam terjadinya *photoaging* melalui peningkatan stres oksidatif, aktivasi jalur inflamasi, dan peningkatan ekspresi Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) yang menyebabkan degradasi kolagen dermis. Air kelapa muda mengandung berbagai senyawa bioaktif dengan aktivitas antioksidan yang berpotensi melindungi kulit dari kerusakan akibat UVB.

**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian air kelapa muda secara oral terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar sinar UVB.

**Metode:** Penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post-test only control group design* dilakukan pada 24 ekor tikus jantan galur Wistar yang dibagi menjadi empat kelompok: kontrol sehat (K1), paparan UVB (K2), UVB + air kelapa muda 4 mL/200 g BB/hari (K3), dan UVB + air kelapa muda 8 mL/200 g BB/hari (K4). Paparan UVB diberikan selama 15 hari dengan dosis kumulatif 800 mJ/cm<sup>2</sup>. Kadar MMP-1 diukur menggunakan metode ELISA, sedangkan ketebalan serabut kolagen dianalisis melalui pewarnaan *Masson's Trichrome*.

**Hasil:** Kelompok yang dipapar sinar UVB menunjukkan kadar MMP-1 yang lebih tinggi ( $p= 0,004$ ) dan ketebalan serabut kolagen yang lebih rendah ( $p = 0,017$ ) dibandingkan kelompok yang tidak di papar sinar UVB. Pemberian air kelapa muda secara oral menunjukkan kadar MMP-1 yang lebih rendah ( $0,004$ ) dan ketebalan serabut kolagen yang lebih tinggi ( $0,000$ ) dibandingkan kelompok yang dipapar sinar UVB tanpa pemberian air kelapa muda, dengan efek paling optimal pada dosis 4 mL/200grBB/hari.

**Kesimpulan:** Pemberian air kelapa muda secara oral berpengaruh secara signifikan terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB.

**Kata kunci:** air kelapa muda, UVB, MMP-1, kolagen, *photoaging*.

## ABSTRACT

**Background:** Exposure to ultraviolet B (UVB) light plays a key role in photoaging through increased oxidative stress, activation of inflammatory pathways, and increased expression of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1), which causes dermal collagen degradation. Young coconut water contains various bioactive compounds with antioxidant activity that have the potential to protect the skin from UVB-induced damage. This study aimed to analyze the effect of oral administration of young coconut water on MMP-1 levels and collagen fiber thickness in male Wistar rats exposed to UVB light.

**Materials and Methods:** A purely experimental study with a post-test only control group design was conducted on 24 male Wistar rats divided into four groups: healthy controls (K1), UVB exposure (K2), UVB + young coconut water 4 mL/200 g BW/day (K3), and UVB + young coconut water 8 mL/200 g BW/day (K4). UVB exposure was given for 15 days at a cumulative dose of 800 mJ/cm<sup>2</sup>. MMP-1 levels were measured using an ELISA method, while collagen fiber thickness was analyzed using Masson's Trichrome staining.

**Result:** The group exposed to UVB light showed higher MMP-1 levels ( $p = 0.004$ ) and lower collagen fiber thickness ( $p = 0.017$ ) compared to the group not exposed to UVB light. Oral administration of young coconut water showed lower MMP-1 levels (0.004) and higher collagen fiber thickness (0.000) compared to the group exposed to UVB light without young coconut water, with the most optimal effect at a dose of 4 mL/200gBW/day. Oral administration of young coconut water significantly affected MMP-1 levels and collagen fiber thickness in the skin of male Wistar rats exposed to UVB light.

**Keywords:** Young coconut water, UVB, MMP-1, collagen, photoaging

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Sinar ultraviolet B (UVB) memiliki panjang gelombang 290–320 nm dengan energi foton yang tinggi, sehingga mampu menembus lapisan epidermis hingga dermis bagian atas. Paparan UVB menyebabkan kerusakan DNA, peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), serta aktivasi jalur sinyal stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan kulit. Efek biologis tersebut memicu terjadinya *photoaging* akut, berbeda dengan UVA yang efeknya bersifat lebih kumulatif dan kronik.<sup>1</sup> Di dalam tubuh, sebenarnya terdapat sistem pertahanan alami terhadap radikal bebas yang disebut antioksidan endogen. Antioksidan endogen berfungsi menetralkan ROS agar tidak merusak struktur seluler seperti lipid membran, protein, dan DNA. Beberapa antioksidan endogen utama meliputi *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *glutathione peroxidase* (GPx). Enzim-enzim ini bekerja secara sinergis untuk mengubah radikal bebas *superoxide* menjadi *hydrogen peroxide*, kemudian menjadi air yang tidak berbahaya. Namun, paparan UVB yang berlebihan dapat menghasilkan ROS dalam jumlah lebih tinggi daripada kapasitas sistem antioksidan endogen, sehingga terjadi ketidakseimbangan yang dikenal sebagai stres oksidatif. Kondisi ini mengaktifkan *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) dan *Nuclear Factor Kappa B* (NF-κB). Aktivasi ini menyebabkan peningkatan kadar enzim *Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1) yaitu enzim proteolitik yang berperan dalam

degradasi kolagen di dermis. Akibatnya, terjadi penurunan jumlah kolagen, hilangnya elastisitas kulit, dan munculnya keriput.<sup>2</sup> Metode yang sering digunakan sebagai pencegahan penuaan kulit dengan penggunaan kosmetik yang mengandung bahan kimia seperti retinol atau tretinoin, namun cara itu memiliki banyak efek samping pada kulit seperti iritasi kulit, gangguan skin barrier, dan meningkatkan fotosensitivitas.<sup>3</sup> Indonesia kaya akan sumber daya alam yang bisa di manfaatkan, salah satu contohnya air kelapa muda. Air kelapa muda merupakan cairan endosperma dari buah *Cocos nucifera L* yang kaya akan senyawa bioaktif. Varietas kelapa hijau wulung lebih banyak dibudidayakan dan umum dijual sebagai air kelapa muda konsumsi maupun untuk terapi tradisional. Varietas ini sering digunakan dalam penelitian lokal karena kandungan antioksidan dan senyawa bioaktifnya lebih kuat.<sup>4</sup> Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya air kelapa muda mengandung beragam senyawa bioaktif penting seperti vitamin C, *L-arginine*, *L-methionine*, sitokinin, selenium, serta mineral mikro seperti Zn, Mn, dan Cu. Kandungan tersebut berperan dalam mekanisme antioksidan dan antiinflamasi melalui peningkatan aktivitas enzim endogen seperti SOD, CAT, dan GPx, serta penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) sebagai penanda peroksidasi lipid.<sup>5</sup> Penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa pemberian *L-arginine* selama 15 hari pada tikus jantan dan betina dapat meningkatkan elastisitas kulit, peningkatan jumlah serabut kolagen dan elastin pada pemeriksaan histologi.<sup>6</sup> Dengan mekanisme tersebut, air kelapa muda diharapkan mampu berperan ganda dalam menangkal ROS dan sintesis kolagen. Namun, masih terbatas

penelitian yang secara spesifik mengkaji pengaruh pemberian air kelapa muda secara oral terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit yang mengalami kerusakan akibat paparan sinar UVB.

Apabila kerusakan akibat paparan UVB tidak dicegah atau ditangani, dampaknya dapat bersifat progresif. Efek biologis dari paparan UVB tidak hanya menimbulkan kerusakan struktural seperti kerutan, hiperpigmentasi, dan penurunan elastisitas kulit, tetapi juga meningkatkan risiko terbentuknya lesi prakanker dan kanker kulit.<sup>7</sup> Paparan kronis sinar UVB berhubungan dengan sekitar 300.000 kasus kanker kulit *non melanoma* di seluruh dunia setiap tahun, yang sebagian besar diakibatkan oleh riwayat terbakar sinar matahari (*sunburn*) dan paparan jangka panjang.<sup>8</sup> Selain kanker kulit, radiasi UVB dapat merusak sel imun pada kulit sehingga menyebabkan penurunan daya tahan kulit (*immunosuppression*), Akibatnya kulit menjadi lebih rentan terhadap infeksi, penyembuhan luka melambat, serta risiko perkembangan kanker kulit semakin meningkat.<sup>9</sup>

Air kelapa muda mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti vitamin C, *L-arginine*, *L-methionine*, sitokinin, selenium, dan mineral mikro (Zn, Mn, Cu) yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi alami. Kandungan ini bekerja dengan menetralkan ROS, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen seperti SOD, CAT, dan GPx, serta menekan aktivasi jalur MAPK dan NF- $\kappa$ B. Efek tersebut menurunkan kadar MMP-1 dan membantu menjaga kestabilan kolagen dermis. Selain itu, vitamin C dan asam amino dalam air kelapa muda berperan dalam sintesis kolagen dengan cara

menstimulasi kadar gen penyusun kolagen dan meningkatkan aktivitas enzim hidroksilase yang penting dalam pembentukan struktur kolagen yang kuat.<sup>4 5</sup>

Upaya penyelesaian dengan memberikan air kelapa muda secara oral pada hewan coba tikus jantan galur wistar yang dipapar sinar UVB. Sinar UVB dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang pada akhirnya menyebabkan peningkatan kadar MMP-1 dan penurunan ketebalan serabut kolagen. Pemberian air kelapa muda diharapkan mampu memberikan efek antioksidan sehingga berpengaruh terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen.

## **1.2. Rumusan masalah**

Apakah pemberian air kelapa muda secara oral mempengaruhi kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Untuk mengetahui pengaruh pemberian air kelapa muda secara oral terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB.

### **1.3.2. Tujuan khusus**

- a. Untuk mengetahui pengaruh pemberian air kelapa muda secara oral dosis 4mL/200g BB/hari dan 8mL/200g BB/hari terhadap kadar

MMP-1 pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB

- b. Untuk mengetahui pengaruh pemberian air kelapa muda secara oral dosis 4mL/200g BB/hari dan 8mL/200g BB/hari terhadap ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB
- c. Mengukur dan membandingkan kadar MMP-1 antar kelompok kontrol dan perlakuan.
- d. Mengukur dan membandingkan ketebalan serabut kolagen pada kulit antar kelompok kontrol dan perlakuan.

#### **1.4. Originalitas Penelitian**

Berdasarkan tinjauan literatur yang penulis lakukan, penelitian tentang pengaruh pemberian air kelapa muda terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus Wistar yang dipapar sinar UVB belum pernah dilakukan. Ada pula penelitian yang terkait dengan penelitian ini adalah:

Tabel 1.1. Originalitas penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
Radenahmad <i>et al.</i> , 2022	<i>Beneficial Effects of Young Coconut Juice on Increasing Skin Thickness, Enhancing Skin Whitening, and Reducing Skin Wrinkles in Ovariectomized Rats</i>	Penelitian eksperimental dengan <i>post test only control group design</i>	Hasil pemeriksaan light mikroskop dengan pewarnaan <i>hematoxylin eosin</i> pada kelompok perlakuan (ovariektomi + pemberian young coconut juice secara oral) terdapat peningkatan ketebalan epidermis, dermis, dan diameter fibril kolagen; optimal pada dosis 40 mL/kgBB/hari ( $p < 0,05$ )
Zulaikhah <i>et al.</i> , 2021	Pengaruh Air Kelapa Muda Terhadap Kadar Antioksidan Endogen Akibat Paparan Asap Rokok pada Tikus Jantan Galur Wistar	Penelitian eksperimental dengan <i>post test only control group design</i>	Hasil pemeriksaan <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) terdapat peningkatan kadar antioksidan endogen enzim <i>glutathione peroxidase</i> (GPx) pada kelompok perlakuan (asap rokok+air kelapa muda 8mL/200 g BB/hari) dan mengalami penurunan pada kelompok kontrol yang hanya dipapar asap rokok. ( $p < 0,05$ )
Zulaikhah <i>et al.</i> , 2016	<i>Tender Coconut Water To Prevent Oxidative Stress Due To Mercury Exposure</i>	Penelitian eksperimental dengan <i>pre and post test only control group design</i>	Hasil pemeriksaan <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) terdapat penurunan indikator stress oksidatif yaitu kadar <i>malondialdehyde</i> (MDA) pada kelompok perlakuan (penambang emas yang terpapar merkuri + air kelapa muda 450ml/hari ) dan mengalami peningkatan pada kelompok kontrol

			(penambang emas yang terpapar merkuri + air putih). ( $p < 0,05$ )
Zulaikhah et al., 2015	<i>Effect of Tender Coconut Water on Antioxidant Enzymatic Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) and Lipid Peroxidation in Mercury Exposure Workers</i>	Penelitian eksperimental dengan <i>pre and post test only control group design</i>	Hasil pemeriksaan <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) terdapat peningkatan kadar antioksidan endogen enzim <i>glutathione peroxidase</i> (GPx), <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD), dan penurunan indikator stress oksidatif kadar <i>malondialdehyde</i> (MDA) pada kelompok perlakuan (penambang emas yang terpapar merkuri + air kelapa muda 450ml/hari) dibandingkan kelompok kontrol (penambang emas yang terpapar merkuri + air putih). ( $p < 0,05$ )
Sauza et al., 2017	<i>The in vivo effect of L-arginine on skin elasticity in mice</i>	Penelitian eksperimental dengan <i>post test only control group design</i>	Hasil pemeriksaan light mikroskop dengan pewarnaan <i>Masson's trichome</i> terdapat peningkatan jumlah serabut kolagen pada kulit tikus betina yang diberi <i>L-arginine</i> 10-15%. ( $p < 0,05$ ) Hasil pemeriksaan light mikroskop dengan pewarnaan Imunohistokimia terdapat peningkatan <i>iNOS</i> pada kelompok tikus yang diberi <i>L-arginine</i> 5-10%. ( $p < 0,05$ )

Penelitian ini berbeda dari penelitian-penelitian sebelumnya karena menggunakan model tikus yang dipapar sinar UVB, serta variabel bebas berupa oral air kelapa muda yang masih jarang diteliti dalam konteks *photoaging*, serta

parameter yang dinilai adalah kadar MMP-1 dalam darah dan ketebalan serabut kolagen kulit secara histopatologi.

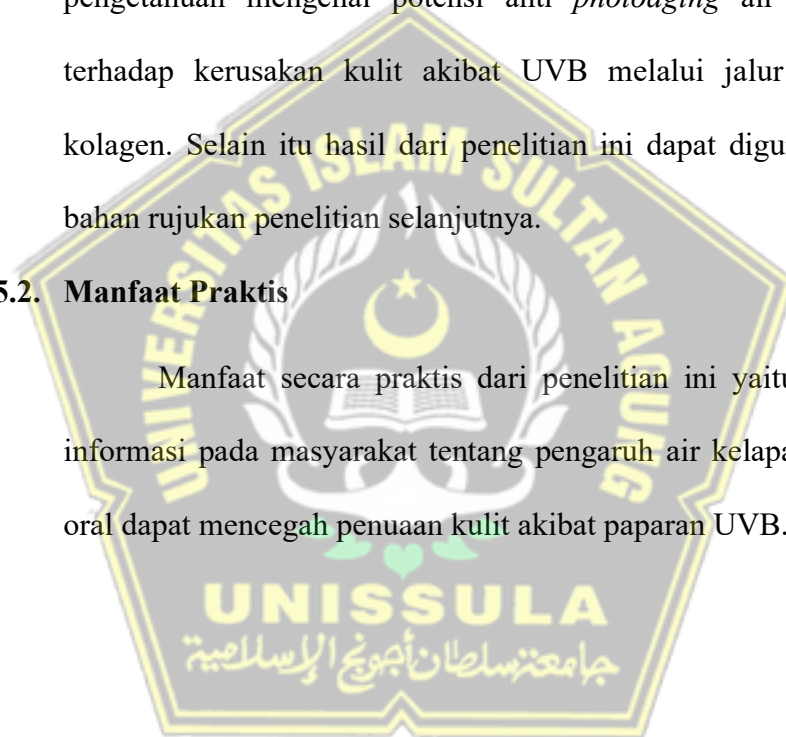
## 1.5. Manfaat Penelitian

### 1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori untuk memberikan pengetahuan mengenai potensi anti *photoaging* air kelapa muda terhadap kerusakan kulit akibat UVB melalui jalur MMP-1 dan kolagen. Selain itu hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan rujukan penelitian selanjutnya.

### 1.5.2. Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini yaitu memberikan informasi pada masyarakat tentang pengaruh air kelapa muda secara oral dapat mencegah penuaan kulit akibat paparan UVB.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Matrix Metalloproteinase

##### 2.1.1. Definisi

*Matrix metalloproteinases* (MMPs) adalah sekelompok besar enzim proteolitik yang bergantung pada ion seng ( $Zn^{2+}$ ) dan ion kalsium ( $Ca^{2+}$ ) untuk aktivitasnya. Enzim ini tergolong dalam famili metzincin, dan memiliki kemampuan untuk mendegradasi komponen-komponen utama matriks ekstraseluler (ECM), seperti kolagen, elastin, gelatin, laminin, fibronectin, dan proteoglikan. MMP diproduksi oleh berbagai jenis sel, seperti fibroblas, keratinosit, sel endotel, sel inflamasi (neutrofil, makrofag), dan sel kanker. Enzim-enzim ini termasuk dalam keluarga *zinc-dependent endopeptidases*, yang berarti aktivitas katalitiknya bergantung pada keberadaan ion seng ( $Zn^{2+}$ ). Adapun MMP disintesis dalam bentuk tidak aktif (proMMP) dan diaktifkan melalui proses proteolitik oleh protease lain atau melalui oksidasi oleh spesies oksigen reaktif (ROS). Secara struktural, sebagian besar MMP memiliki domain pro-peptida (yang mempertahankan bentuk inaktif), domain katalitik yang mengandung  $Zn^{2+}$ , serta domain hemopeksin yang menentukan spesifisitas substrat dan interaksi dengan inhibitor. Aktivitas MMP dikendalikan secara ketat oleh inhibitor spesifik yang disebut *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Dalam kondisi

fisiologis, MMP berperan penting dalam remodeling jaringan, penyembuhan luka, perkembangan embrio, dan angiogenesis. Namun, disregulasi atau overkadar MMP dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang berlebihan dan berkontribusi terhadap berbagai penyakit, seperti artritis, kanker, penyakit kardiovaskular, dan penuaan kulit.<sup>10,11</sup>

### 2.1.2. Klasifikasi

Berdasarkan struktur domain dan spesifisitas substratnya, MMP diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok utama, yaitu *collagenase*, *gelatinase*, *stromelysin*, *matrilysin*, *membrane-type MMP* (MT-MMP), serta kelompok non-klasik. Setiap kelompok memiliki karakteristik tersendiri dalam hal substrat target dan fungsi biologisnya. Misalnya, *collagenase* berperan dalam degradasi kolagen fibriler, sementara *gelatinase* berperan terhadap gelatin dan kolagen tipe IV pada membran basal. Adapun kelompok MT-MMP menonjol karena terikat pada membran sel dan berperan dalam aktivasi pro-MMP lain di lingkungan sekitar sel. Rincian mengenai klasifikasi MMP, termasuk contoh tiap kelompok, substrat utama, dan fungsi spesifiknya, dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1. Klasifikasi MMP**

<b>Kelas MMP</b>	<b>Contoh MMP</b>	<b>Substrat Utama</b>	<b>Fungsi</b>
Collagenase	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Kolagen fibriler tipe I, II, III	Degradasi kolagen triple-heliks fibrilar
Gelatinase	MMP-2, MMP-9	Gelatin, kolagen tipe IV, V, elastin, laminin	Pembongkaran gelatin dan membran basal; penting dalam migrasi sel dan angiogenesis
Stromelysin	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Proteoglikan, laminin, fibronectin, kolagen non-fibriler, gelatin	Degradasi ECM non-kolagen; aktivasi pro-MMP lain
Matrilysin	MMP-7, MMP-26	Fibronectin, laminin, kolagen IV, gelatin, proteoglikan, elastin	Peran dalam imunitas mukosa dan remodeling jaringan epitel
Membrane-Type MMP (MT-MMP)	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25	Gelatin, fibronectin, laminin, proteoglikan, pro-MMP-2, pro-MMP-13	Terikat pada membrane sel, aktifkan pro-MMP lokal, penting dalam invasi sel kanker
Lain-lain / Non-klasik	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-27, MMP-28	Beragam: elastin, enamelin, aggregan, dan substrat khusus lainnya	Fungsi spesifik di jaringan tertentu

Keterangan pada tabel :

1. *Collagenase* adalah satu-satunya subkelompok MMP yang dapat memecah kolagen tipe fibriler (I, II, III) pada lokasi spesifik di tengah molekul.
2. *Gelatinase* sangat penting dalam proses invasi sel karena dapat menghancurkan kolagen tipe IV di membran basal.
3. *Stromelysin* tidak dapat memecah kolagen fibriler, tetapi mampu mendegradasi berbagai komponen ECM dan mengaktifasi MMP lain.
4. *Matrilysin* adalah MMP terkecil, tidak memiliki domain hemopeksin, namun tetap aktif terhadap berbagai substrat.

5. MT-MMP memiliki domain transmembran yang menempel pada permukaan sel dan memainkan peran penting dalam invasi sel kanker dan aktivasi proMMP lain secara lokal.<sup>10,11</sup>

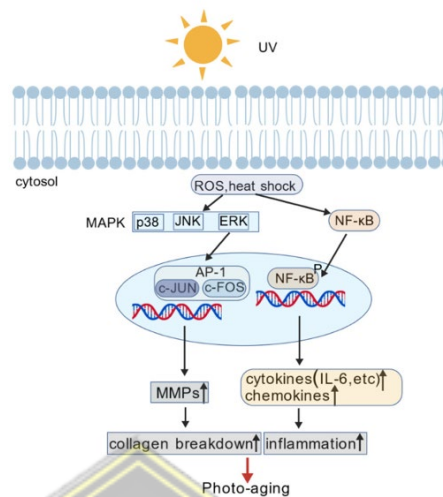
### 2.1.3. Regulasi MMP-1 oleh ROS dan Sinar UV

Paparan sinar UVB secara langsung menyebabkan peningkatan produksi ROS di dalam sel kulit, terutama di lapisan epidermis dan dermis. ROS seperti *superoxide* ( $O_2^-$ ), *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), dan *hydroxyl radical* ( $\bullet OH$ ) menstimulasi aktivasi jalur transduksi sinyal intraseluler, terutama jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK) seperti ERK1/2, JNK, dan p38 MAPK. Aktivasi jalur ini menyebabkan fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi c-Fos dan c-Jun, yang bergabung membentuk kompleks *Activator Protein-1* (AP-1). AP-1 kemudian berikatan dengan elemen spesifik pada promotor gen MMP-1 dan meningkatkan transkripsinya, sehingga produksi MMP-1 meningkat secara signifikan.<sup>7</sup>

Selain itu, ROS juga dapat mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- $\kappa B$ ) melalui degradasi I $\kappa$ B $\alpha$  yang merupakan inhibitor dari NF- $\kappa B$ . Sehingga NF- $\kappa B$  dapat translokasi ke nukleus dan menginduksi transkripsi MMP-1 sebagai respons terhadap stres oksidatif. ROS bertindak sebagai sinyal *second messenger* yang memperkuat respons terhadap sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , yang juga menginduksi MMP-1 melalui jalur NF- $\kappa B$  dan AP-1.

Selain mengatur pada tingkat transkripsi, ROS juga dapat menyebabkan modifikasi epigenetik seperti perubahan histon atau metilasi DNA pada gen promotor MMP-1, sehingga menurunkan atau meningkatkan afinitas faktor transkripsi terhadap DNA (hiperaktivasi transkripsi MMP-1). Tidak hanya pada tingkat transkripsi, ROS juga berperan dalam aktivasi enzimatik MMP-1 melalui oksidasi residu cysteine pada pro-domain MMP-1, mengganggu “*cysteine switch*” dan mengaktifkan enzim tanpa perlu protease lain. ROS bahkan dapat menginaktivasi *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1* (TIMP-1), yang secara normal menghambat MMP-1, sehingga menyebabkan aktivitas MMP-1 menjadi tidak terkontrol. Aktivasi MMP-1 ini berujung pada degradasi kolagen tipe I dan III, yang merupakan komponen utama dermis, menyebabkan hilangnya struktur kulit, elastisitas, dan munculnya keriput.

Mekanisme jalur molekuler tersebut secara ringkas digambarkan pada Gambar 2.1, yang menunjukkan hubungan antara paparan sinar UV, peningkatan ROS, aktivasi jalur MAPK dan NF- $\kappa$ B, peningkatan kadar MMP, serta terjadinya *collagen breakdown* dan inflamasi yang berujung pada proses *photoaging*.<sup>2 12 13</sup>



Gambar 2.1. UV terhadap *Photoaging*

#### 2.1.4. Peran MMP-1 dalam Degradasi Kolagen

*Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1) merupakan anggota dari keluarga enzim *collagenase* yang memiliki kemampuan spesifik untuk memecah kolagen fibriler, terutama tipe I, II, dan III, yang merupakan komponen utama matriks ekstraseluler (ECM) pada jaringan seperti kulit, tendon, dan ligamen. Enzim ini juga dikenal sebagai *fibroblast collagenase* atau *interstitial collagenase*, karena terutama disekresi oleh fibroblas, sel epitel, dan sel imun, baik dalam kondisi fisiologis maupun patologis. Kolagen fibriler memiliki struktur *triple helix* yang sangat stabil dan resisten terhadap enzim proteolitik biasa. Oleh karena itu, degradasinya memerlukan enzim khusus seperti MMP-1, yang mampu memutus *triple helix* tersebut pada lokasi spesifik, yaitu sekitar  $\frac{3}{4}$  bagian N-terminal dan  $\frac{1}{4}$  bagian C-terminal, menghasilkan dua fragmen kolagen besar berbentuk gelatin. Fragmen-fragmen ini

kemudian didegradasi lebih lanjut oleh gelatinase seperti MMP-2 atau MMP-9. Dalam kondisi fisiologis, MMP-1 berperan penting dalam remodeling jaringan, mendukung migrasi sel melalui degradasi ECM, serta terlibat dalam proses penyembuhan luka dan mekanisme adaptif seperti pertumbuhan tulang dan regresi vaskular. Namun, jika MMP-1 dikadarkan secara berlebihan, ia dapat menyebabkan degradasi kolagen yang tidak terkendali, sehingga berkontribusi pada berbagai kondisi patologis. Pada kulit, misalnya, paparan sinar UVB meningkatkan kadar MMP-1 melalui aktivasi jalur transkripsi AP-1, yang pada akhirnya menyebabkan degradasi kolagen dermis, hilangnya elastisitas kulit, dan munculnya keriput, suatu proses yang dikenal sebagai *photoaging*. Dalam penyakit inflamasi kronis seperti *rheumatoid arthritis*, MMP-1 yang disekresikan oleh sinoviosit dan makrofag menghancurkan kolagen sendi, mengakibatkan kerusakan kartilago. Sementara itu, dalam kanker, MMP-1 berperan dalam meningkatkan invasivitas dan metastasis sel tumor dengan membuka barrier ECM. Kadar MMP-1 diatur oleh berbagai stimulus seperti UVB, sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), dan *reactive oxygen species* (ROS), yang semuanya berkontribusi pada peningkatan transkripsi MMP-1 melalui aktivasi jalur AP-1 dan NF- $\kappa$ B. Sebaliknya, retinoid seperti vitamin A dapat menekan kadar MMP-1 dan memberikan efek protektif terhadap penuaan kulit. Untuk menjaga keseimbangan aktivitasnya, tubuh menghasilkan inhibitor alami bernama *Tissue Inhibitor of*

*Metalloproteinases-1* (TIMP-1), yang secara spesifik menghambat MMP-1. Ketidakseimbangan antara MMP-1 dan TIMP-1, baik berupa kelebihan MMP-1 maupun kekurangan TIMP-1, dapat mengarah pada degradasi kolagen berlebihan seperti pada penuaan, atau sebaliknya, akumulasi kolagen yang tidak terkontrol seperti pada fibrosis. Oleh karena itu, regulasi MMP-1 sangat penting untuk mempertahankan homeostasis jaringan dan mencegah kerusakan struktural pada berbagai organ. <sup>10 11 14</sup>

## 2.2. Kolagen

### 2.2.1. Pengertian dan Klasifikasi

Kolagen memiliki fungsi utama sebagai komponen struktural dalam jaringan tubuh, namun perannya jauh lebih luas daripada sekadar "penopang mekanis". Kolagen berfungsi untuk menjaga integritas, kekuatan, dan elastisitas jaringan, serta terlibat dalam berbagai proses biologis penting seperti penyembuhan luka, diferensiasi sel, hingga regenerasi jaringan. Dalam kulit, kolagen tipe I dan III bekerja sama untuk memberikan kekuatan tarik dan elastisitas, menjadikan kulit kenyal dan tidak mudah robek. Di tulang, kolagen tipe I menjadi rangka dasar (*scaffold*) tempat pengendapan mineral seperti kalsium fosfat, sehingga tulang menjadi keras namun tetap fleksibel. Di kartilago, kolagen tipe II memberikan kekuatan tekan yang memungkinkan sendi menahan beban dan bergerak secara lentur. Kolagen tipe IV, yang tidak membentuk fibril, berfungsi menyusun membran basalis yang

mendasari lapisan epitel, termasuk di ginjal dan paru, berperan sebagai filter molekuler dan tempat melekatnya sel-sel epitel. Kolagen juga berperan penting dalam hemostasis dan penyembuhan luka, karena berinteraksi dengan trombosit untuk memicu pembentukan bekuan darah serta menjadi kerangka bagi migrasi fibroblas dan pembentukan jaringan baru. Selain itu, kolagen memengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel, serta mengatur komunikasi antar sel melalui interaksi dengan reseptor permukaan seperti integrin. Kolagen bahkan berperan dalam proses imun, karena fragmentasi kolagen akibat stres oksidatif atau enzimatis dapat berperan sebagai sinyal bahaya *damage associated molecular patterns* (DAMPs) yang memicu respon inflamasi. Secara keseluruhan, kolagen bukan hanya komponen struktural pasif, tetapi merupakan molekul bioaktif yang sangat penting untuk homeostasis jaringan, perbaikan sel, dan fungsi fisiologis normal tubuh.<sup>15 16</sup>

### 2.2.2. Fungsi Kolagen

Kolagen adalah protein struktural utama dalam tubuh manusia yang menyusun sekitar 30% dari total protein tubuh. Fungsinya yang paling mendasar adalah sebagai bahan penyusun matriks ekstraseluler yang memberikan kekuatan, struktur, dan integritas mekanis pada berbagai jaringan seperti tulang, tendon, ligamen, kartilago, dan kulit. Selain memberikan dukungan struktural, kolagen juga berperan dalam proses biologis penting seperti regenerasi jaringan, penyembuhan luka, adhesi sel, diferensiasi sel, dan angiogenesis. Kolagen membentuk

jaringan yang fleksibel namun kuat, memungkinkan organ dan jaringan menahan tekanan mekanis tanpa robek. Ada lebih dari 28 tipe kolagen yang telah diidentifikasi, dan masing-masing memiliki peran tersendiri dalam berbagai organ dan sistem tubuh.

Kolagen memiliki peran yang sangat penting dalam menjaga struktur, fungsi, dan penampilan kulit. Sebagai protein utama dalam matriks ekstraseluler kulit, kolagen bertanggung jawab atas kekuatan tarik, elastisitas, dan integritas jaringan dermis. Di kulit, kolagen memberikan fondasi struktural yang menopang lapisan epidermis dan menjaga kekenyalan kulit agar tetap kencang dan halus. Kolagen juga berperan penting dalam proses regenerasi dan penyembuhan luka, karena ia menyediakan kerangka bagi migrasi sel, proliferasi fibroblas, dan deposisi jaringan baru. Jenis kolagen yang paling dominan di kulit adalah kolagen tipe I dan III yang terdapat di dermis, serta kolagen tipe IV yang membentuk membran basal di antara epidermis dan dermis.<sup>16</sup>

Kolagen tipe I merupakan jenis kolagen yang paling melimpah di kulit, menyusun sekitar 80–90% dari total kolagen di dermis, terutama pada lapisan retikular dermis. Kolagen ini berfungsi memberikan kekuatan tarik dan kekencangan kulit, menjaga struktur dermis, serta mendukung regenerasi jaringan. Selain itu, kolagen tipe I berperan penting dalam proses penyembuhan luka dengan membentuk jaringan parut yang kuat. Kolagen tipe III, yang sering hadir bersama kolagen tipe I dan menyumbang sekitar 10–20% kolagen dermis,

banyak ditemukan pada papillary dermis dan di sekitar pembuluh darah. Perannya adalah memberikan dukungan struktural dan elastisitas halus, penting dalam jaringan yang sedang tumbuh atau mengalami regenerasi, serta berkontribusi pada pembentukan pembuluh darah (*angiogenesis*) dan menjaga homeostasis dermis. Sementara itu, kolagen tipe IV merupakan komponen utama membran basal yang memisahkan epidermis dan dermis. Kolagen ini tidak membentuk serat, tetapi membentuk jaringan anyaman yang menjadi penopang adhesi sel basal epidermis, menyediakan struktur dan filter selektif untuk komunikasi antar lapisan kulit, serta berperan dalam regulasi proliferasi dan migrasi sel kulit. Seiring penuaan atau akibat kerusakan oleh sinar ultraviolet, kolagen tipe I dan III akan menurun sehingga kulit menjadi kendur, berkerut, tipis, dan rapuh, sedangkan kerusakan kolagen tipe IV dapat mengganggu regenerasi epidermis serta merusak integritas struktur kulit.<sup>16</sup>

### 2.2.3. Sintesis dan Degradasi Kolagen

Sintesis kolagen adalah proses biologis yang kompleks dan terkoordinasi, dimulai di dalam sel fibroblas, osteoblas, atau kondrosit, tergantung jaringan tempat kolagen dibentuk. Proses ini diawali dengan transkripsi gen kolagen menjadi mRNA, yang kemudian diterjemahkan di ribosom menjadi rantai polipeptida prekursor yang disebut preprokolagen. Rantai ini mengalami modifikasi pascatranslasi di retikulum endoplasma, termasuk hidroksilasi residu prolin dan lisin

(dengan bantuan *enzim prolyl* dan *lysyl hydroxylase* serta kofaktor vitamin C) serta glikosilasi residu hidroksilisin. Tiga rantai polipeptida kemudian berpilin membentuk prokolagen berbentuk *triple helix*, yang dikemas dalam vesikel dan disekresikan ke ruang ekstraseluler. Di luar sel, enzim prokolagen peptidase memotong ujung terminal prokolagen untuk menghasilkan tropokolagen, yang kemudian beragregasi membentuk fibril kolagen. Fibril ini distabilkan oleh ikatan silang kovalen antar molekul tropokolagen melalui aktivitas *lysyl oxidase*, menghasilkan serabut kolagen yang kuat dan tahan tarik.<sup>15 17</sup>

Degradasi kolagen, atau kolagenolisis, merupakan proses fisiologis yang terjadi selama remodeling jaringan, penyembuhan luka, dan proses patologis seperti penuaan atau penyakit degeneratif. Proses ini dimulai dengan pemutusan struktur *triple helix* kolagen oleh enzim *matrix metalloproteinase* (MMP), terutama MMP-1 (*interstitial collagenase*) yang memotong kolagen tipe I, II, dan III pada situs spesifik. Fragmen kolagen hasil pemotongan kemudian didegradasi lebih lanjut oleh *gelatinase* (MMP-2 dan MMP-9) menjadi peptida yang lebih kecil. Aktivitas MMP dikendalikan oleh *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) untuk menjaga keseimbangan antara sintesis dan degradasi. Ketidakseimbangan, seperti peningkatan MMP akibat paparan sinar UV atau inflamasi kronis, dapat menyebabkan penurunan kolagen berlebihan yang berkontribusi pada *photoaging* dan penurunan elastisitas kulit.<sup>15 17</sup>

#### 2.2.4. Regulasi Kolagen oleh ROS dan Sinar UVB

Paparan sinar ultraviolet B (UVB) dengan panjang gelombang 280–320 nm memiliki efek merugikan pada jaringan kulit melalui induksi stres oksidatif. Energi yang ditimbulkan oleh UVB memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat merusak DNA, protein, dan lipid, sekaligus mengaktifasi jalur transduksi sinyal intraseluler. Aktivasi jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) selanjutnya menstimulasi faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1), yang berperan penting dalam regulasi kadar gen pengkode enzim degradasi matriks. Salah satu target utama dari jalur ini adalah peningkatan kadar *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1), yaitu enzim yang bertanggung jawab dalam degradasi kolagen tipe I dan III, dua komponen kolagen utama pada dermis. Peningkatan MMP-1 menyebabkan percepatan kerusakan kolagen.<sup>7 2</sup>

*Transforming growth factor-β* (TGF-β) merupakan sitokin utama yang berperan dalam regulasi sintesis kolagen melalui aktivasi jalur TGF-β/Smad. Pada kondisi fisiologis, TGF-β berikatan dengan reseptornya (TβRII dan TβRI), kemudian memfosforilasi Smad2/3 yang berikatan dengan Smad4 untuk masuk ke inti sel dan menginduksi transkripsi gen kolagen tipe I (COL1A1, COL1A2) dan kolagen tipe III (COL3A1). Namun, paparan sinar UVB terbukti dapat menekan jalur ini melalui induksi stres oksidatif dan aktivasi jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), yang selanjutnya meningkatkan kadar faktor transkripsi *activator protein-1* (AP-1). Aktivasi AP-1 menghambat

kadar T $\beta$ RII pada fibroblas dermal sehingga mengurangi aktivasi Smad2/3. Akibatnya, sintesis kolagen baru menurun secara signifikan. Selain itu, Sinar UVB menginduksi Smad7 (*inhibitory Smad*) melalui aktivasi AP-1. Smad7 bekerja menghambat fosforilasi Smad2/3 dan memfasilitasi degradasi reseptor TGF- $\beta$  melalui mekanisme ubiquitinasi. sehingga respons prokolagen semakin tertekan.<sup>13</sup>

Bersamaan dengan peningkatan degradasi kolagen akibat kadar *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1), penekanan jalur TGF- $\beta$  oleh paparan UVB semakin memperparah kerusakan jaringan kolagen dermis yang berkontribusi pada proses *photoaging*. Kombinasi peningkatan degradasi kolagen oleh MMP dan penurunan sintesis prokolagen melalui hambatan TGF- $\beta$  / Smad menyebabkan ketidakseimbangan homeostasis matriks. Fragmentasi kolagen akibat aktivasi MMP-1 menghasilkan fragmen yang berperan sebagai *damage associated molecular patterns* (DAMPs) sehingga mengaktifasi jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK, memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), dan *Interleukin-6* (IL-6) yang memperkuat respons inflamasi lokal dan menstimulasi kembali kadar MMP-1 sehingga memperparah degradasi kolagen dan menciptakan siklus patologis berulang antara kerusakan kolagen dan inflamasi kronik pada kulit yang terpapar UVB..<sup>2 13</sup>

## 2.3. Air Kelapa Muda

### 2.3.1. Definisi Air Kelapa Muda

Air kelapa muda (*Tender Coconut Water*) merupakan cairan alami yang terdapat di dalam endosperma buah kelapa muda (*Cocos nucifera Linn.*), yaitu tanaman palma yang banyak tumbuh di daerah tropis, termasuk Indonesia sebagai salah satu negara dengan produksi kelapa terbesar di dunia. Air kelapa muda dikenal sebagai “*the fluid of life*” karena memiliki komposisi elektrolit dan tekanan osmotik yang menyerupai plasma darah manusia, sehingga berfungsi sebagai minuman isotonik alami yang mampu menjaga keseimbangan cairan tubuh. Air kelapa muda biasanya diperoleh dari buah kelapa berusia sekitar 5–7 bulan dengan volume air berkisar antara 500–750 mL, tergantung pada varietas dan tingkat kematangan buah. Pada tahap ini, daging buah masih lunak seperti agar-agar (*jelly like endosperm*), dengan kandungan air dan gula yang mencapai puncaknya, menghasilkan cita rasa manis dan menyegarkan. Seiring bertambahnya usia buah, kandungan air dan kadar gula akan menurun, sementara daging buah menjadi lebih tebal dan keras.

Air kelapa muda mengandung beragam makro dan mikronutrien penting seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, fosfor, seng, mangan, tembaga, serta vitamin C dan berbagai asam amino esensial seperti *L-arginine*, *L-methionine*, *L-threonine*, dan *L-lysine*. Selain itu, air kelapa muda juga mengandung hormon pertumbuhan alami seperti

sitokinin, auksin, dan giberelin yang berperan dalam regenerasi dan perlindungan sel terhadap kerusakan akibat radikal bebas. Komposisi tersebut menjadikan air kelapa muda tidak hanya berfungsi sebagai sumber hidrasi, tetapi juga memiliki efek fisiologis yang luas seperti antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif, dan kardioprotektif.

Kandungan gizi air kelapa muda sangat dipengaruhi oleh umur buah, varietas kelapa, serta kondisi tanah dan lingkungan tempat tumbuhnya. Berdasarkan varietasnya, kelapa secara umum dibedakan menjadi tiga kelompok besar, yaitu kelapa genjah (*dwarf coconut*), kelapa dalam (*tall coconut*), dan kelapa hibrida (*hybrid coconut*).

Varietas Kelapa Genjah (*Dwarf Coconut*) memiliki masa berbuah lebih cepat, yaitu pada usia sekitar 4–6 tahun setelah penanaman. Pohonnya berukuran pendek dan menghasilkan buah lebih kecil dengan jumlah yang banyak. Contoh varietasnya meliputi kelapa gading (*Eburnia variety*), kelapa raja (*Regia*), kelapa raja Malabar (*Preciosa*), dan kelapa puyuh (*Pumila*). Air dari kelapa genjah umumnya memiliki rasa lebih manis dan sering digunakan sebagai air kelapa muda konsumsi karena cita rasanya yang segar.

Varietas Kelapa Dalam (*Tall Coconut*) berbuah lebih lambat, biasanya setelah usia 10–15 tahun, dengan tinggi pohon dapat mencapai sekitar 30 meter dan umur produktif hingga 70 tahun. Contoh varietasnya antara lain kelapa hijau (*Cocos nucifera var. viridis*) dan kelapa merah (*Cocos nucifera var. rubescens*).

Varietas kelapa hijau sendiri, terdapat dua jenis utama yaitu Kelapa Hijau Wulung, yang memiliki warna kulit buah hijau tua agak keunguan, dengan kandungan mineral (terutama kalium, magnesium, dan fosfor) serta asam amino seperti *L-methionine* dan *L-arginine* yang lebih tinggi. Jenis ini sering digunakan dalam penelitian karena kandungan antioksidan dan senyawa bioaktifnya lebih kuat. Jenis kedua Kelapa Hijau Biasa (*Ordinary Green Coconut*), berwarna hijau muda cerah dengan rasa air yang lebih ringan dan segar. Kandungan nutrisinya juga tinggi, namun sedikit lebih rendah dibanding kelapa hijau wulung. Kedua jenis kelapa hijau tersebut umumnya digunakan sebagai sumber air kelapa muda (*tender coconut water*) dengan rentang usia buah 5–7 bulan, yaitu saat kandungan air, gula, dan zat bioaktif berada pada titik optimal

Varietas Kelapa Hibrida (*Hybrid Coconut*) merupakan hasil persilangan antara kelapa genjah dan kelapa dalam untuk memperoleh keunggulan dari keduanya, yaitu ukuran buah sedang, produktivitas tinggi, rasa air yang manis, serta ketahanan yang baik terhadap penyakit. Varietas hibrida juga mulai berbuah dalam waktu lebih singkat dibanding kelapa dalam, sehingga banyak dikembangkan secara komersial.<sup>18 4 19</sup>

### 2.3.2. Komposisi Air Kelapa Muda

Komposisi kimia air kelapa muda bervariasi tergantung pada varietas dan tingkat kematangan buah. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan oleh Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) serta Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada, diketahui bahwa air kelapa hijau (*Cocos nucifera var. viridis*) terdiri atas dua jenis utama, yaitu kelapa hijau wulung dan kelapa hijau biasa (*ordinary*). Keduanya memiliki kandungan vitamin, asam amino, dan mineral yang berbeda sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2. Komposisi Coconut Water Viridis Varieties**

Component / Components	Type of Green Coconut ( <i>Viridis</i> ) Wulung	Type of Green Coconut ( <i>Viridis</i> ) Ordinary
<b>Vitamin C (mg/L)</b>	32.50	32.50
<b>Asam Amino (µg/mL)</b>		
L-Aspartic	115.60	30.81
L-Glutamic	56.65	28.90
L-Glutamine	<0.05	6.32
L-Threonine	25.15	13.40
L-Glycine	19.01	16.08
L-Arginine	12.68	12.63
L-Alanine	22.18	22.97
L-Tyrosine	23.57	9.95
L-Tryptophan + L-Methionine	<0.13	235.22
L-Valine	13.27	11.83
L-Phenylalanine	12.68	8.80
L-Isoleucine	10.10	11.48
L-Leucine	19.61	17.80
L-Lysine	23.77	26.22
L-Histidine + Serine	47.34	26.41
<b>Mineral (mg/Kg)</b>		
Cu (Cuprum)	<0.02	0.40
Fe (Iron)	6.00	0.39
Mg (Magnesium)	146.16	74.24
Mn (Mangan)	0.23	2.50
Zn (Zinc)	2.20	0.83
Na (Natrium)	560.03	24.22
K (Potassium)	6.31	2908.46
P (Phosphor)	8.76	94.43

Kandungan vitamin C pada kedua jenis kelapa hijau relatif sama, yaitu sebesar 32,5 mg/L. Namun, perbedaan nyata terlihat pada kadar asam amino dan mineral. Kelapa hijau wulung memiliki kadar *L-aspartic* (115,60 µg/mL), *L-glutamic* (56,65 µg/mL), serta magnesium (146,16 mg/kg) yang lebih tinggi dibandingkan kelapa hijau biasa. Sebaliknya, kelapa hijau *ordinary* memiliki kadar *L-tryptophan* + *L-methionine* (235,22 µg/mL) dan kalium (2908,46 mg/kg) yang jauh lebih besar daripada jenis wulung. Perbedaan kadar nutrisi ini menunjukkan bahwa masing-masing varietas memiliki keunggulan fisiologis tersendiri. Kelapa wulung lebih kaya akan asam amino pembentuk protein dan enzim antioksidan, sedangkan kelapa hijau biasa memiliki kandungan elektrolit yang lebih tinggi sehingga berperan optimal dalam menjaga keseimbangan cairan tubuh. <sup>18 4 19</sup>

### 2.3.3. Kandungan dan Peranan Air Kelapa Muda

#### 2.3.3.1 Vitamin C

Vitamin C merupakan salah satu komponen antioksidan utama dalam air kelapa muda yang berperan penting dalam melindungi kulit dari stres oksidatif akibat paparan sinar UVB. Sebagai antioksidan, vitamin C mendonorkan elektron untuk menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga mencegah kerusakan pada lipid membran, protein, dan DNA sel kulit. Aktivitas antioksidan ini

juga membantu menekan peningkatan ROS yang dapat mengaktivasi jalur inflamasi.

Peningkatan ROS dapat memicu aktivasi enzim *IκB kinase* (IKK) yang berperan dalam pelepasan faktor transkripsi NF-κB dari kompleks pengikatnya di sitoplasma. Aktivasi NF-κB selanjutnya menginduksi kadar mediator inflamasi dan enzim *Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1) yang bertanggung jawab terhadap degradasi kolagen dermal. Vitamin C mampu menghambat aktivasi IKK dan menurunkan fosforilasi pada jalur MAPK–AP-1, sehingga kadar MMP-1 dapat ditekan dan fragmentasi kolagen dapat dicegah.

Selain berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi, vitamin C juga berperan penting dalam pembentukan kolagen. Senyawa ini merupakan kofaktor enzim *prolyl hydroxylase* dan *lysyl hydroxylase* yang diperlukan dalam proses hidrosilasi prolin dan lisin pada tahap pembentukan rantai kolagen. Dengan demikian, ketersediaan vitamin C yang cukup dapat meningkatkan sintesis kolagen, memperkuat struktur matriks dermal, dan mempertahankan elastisitas serta kekenyalan kulit .<sup>4 20 21</sup>

### 2.3.3.2 L- Arginine

*L-Arginine* adalah asam amino semi-esensial yang berperan penting dalam sistem pertahanan antioksidan seluler

dan proses pembentukan kolagen. Dalam air kelapa muda, *L-arginine* berfungsi sebagai prekursor pembentukan *nitric oxide* (NO) melalui aktivitas enzim *nitric oxide synthase* (NOS). NO dalam kadar fisiologis meningkatkan proliferasi fibroblas dan meningkatkan kadar gen kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ . Selain itu, *L-arginine* merupakan prekursor *glutathione* (GSH), antioksidan endogen utama yang menjaga lingkungan redoks sel fibroblas agar tetap optimal untuk sintesis kolagen.

Paparan UVB diketahui menurunkan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPx), namun *L-arginine* dapat memulihkan aktivitas kedua enzim tersebut, menekan pembentukan ROS, dan menghambat aktivasi jalur inflamasi MAPK–NF- $\kappa$ B. Hasil akhirnya adalah penurunan kadar MMP-1, perlindungan terhadap degradasi kolagen dermal, serta peningkatan sintesis kolagen baru.<sup>21 4 6</sup>

### 2.3.3.3 L-Methionine

*L-Methionine* merupakan asam amino yang mengandung sulfur dan berperan penting dalam sistem antioksidan endogen. Sebagai prekursor pembentukan *cysteine* dan *glutathione* (GSH), *L-methionine* membantu menjaga keseimbangan redoks sel fibroblas dan menetralkan ROS yang

dihasilkan akibat paparan UVB. Aktivitas antioksidan ini menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK, yang berkontribusi terhadap penurunan kadar MMP-1. Selain itu, *L-methionine* berperan dalam pembentukan *S-adenosylmethionine* (SAM) yang mengatur kadar gen pembentuk kolagen melalui proses metilasi. Kandungan sulfur methionine juga mendukung pembentukan ikatan disulfida yang memperkuat struktur kolagen dan jaringan elastik. Dengan demikian, methionine berperan penting dalam menjaga keseimbangan antioksidan, menekan inflamasi, serta meningkatkan sintesis dan stabilitas kolagen dermal.<sup>21 22 4</sup>

#### 2.3.3.4 Sitokinin

Sitokinin merupakan hormon tumbuhan alami yang terdapat dalam air kelapa muda dan dikenal memiliki aktivitas anti aging. Sebagai antioksidan non enzimatis, sitokinin bekerja dengan menghambat pembentukan ROS dan mencegah kerusakan DNA serta apoptosis sel fibroblas akibat paparan UVB. Penurunan stres oksidatif ini berdampak pada penghambatan jalur NF- $\kappa$ B dan AP-1, sehingga menurunkan kadar MMP-1 yang menyebabkan fragmentasi kolagen. Selain itu, sitokinin mampu merangsang pembelahan dan aktivitas fibroblas, serta meningkatkan kadar gen yang berperan dalam pembentukan kolagen di dermis melalui stimulasi TGF- $\beta$ .

Dengan demikian, sitokinin berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan stimulator kolagen, yang secara sinergis melindungi kulit dari kerusakan akibat UVB dan mempercepat regenerasi jaringan derma.<sup>21 22 4</sup>

#### 2.3.3.5 Selenium

Selenium adalah mineral esensial yang menjadi komponen utama enzim *glutathione peroxidase* (GPx), yang berperan dalam menetralkan peroksida lipid dan hidrogen peroksida. Melalui peningkatan aktivitas GPx, selenium membantu mengurangi stres oksidatif dan mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B, sehingga menekan kadar sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6, serta menurunkan kadar MMP-1. Selain itu, selenium berperan dalam mempertahankan fungsi fibroblas dan meningkatkan efisiensi sintesis kolagen dengan menjaga keseimbangan redoks seluler. Kombinasi efek antioksidan dan antiinflamasi ini menjadikan selenium penting dalam mencegah degradasi kolagen serta mendukung pembentukan jaringan dermal baru.<sup>21 22 4</sup>

#### 2.3.3.6 Mineral (Magnesium, Seng, Mangan)

Air kelapa muda mengandung mineral penting seperti magnesium (Mg), seng (Zn), dan mangan (Mn) yang berfungsi sebagai kofaktor enzim antioksidan dan pembentuk kolagen.

Magnesium membantu menstabilkan DNA serta mendukung proses transkripsi gen kolagen; seng berperan sebagai komponen enzim Cu/Zn-SOD yang menetralkan radikal superoksida dan menekan jalur AP-1, sedangkan mangan merupakan kofaktor Mn-SOD yang melindungi mitokondria dari stres oksidatif. Kombinasi mineral ini meningkatkan kapasitas antioksidan kulit, menurunkan aktivasi NF- $\kappa$ B, menghambat pembentukan MMP-1, dan mempertahankan aktivitas fibroblas untuk sintesis kolagen. Dengan demikian, ketiga mineral tersebut berperan penting dalam menjaga integritas jaringan kolagen dermal dari kerusakan akibat UVB.

21 22 4

#### 2.3.3.7 L-Aspartic dan L-Glutamic Acid

*L-Aspartic dan L-Glutamic acid* berperan sebagai antioksidan ringan yang membantu menetralkan ROS akibat paparan sinar UVB, sehingga melindungi sel fibroblas dari kerusakan oksidatif. Kedua asam amino ini juga memiliki efek antiinflamasi dengan menekan aktivasi jalur NF- $\kappa$ B, sehingga menurunkan kadar *Matrix Metalloproteinase-1* (MMP-1) dan mencegah degradasi kolagen dermal. Selain itu, *L-Aspartic* dan *L-Glutamic* menyediakan energi seluler melalui siklus asam sitrat dan menjaga keseimbangan pH intrasel yang diperlukan untuk aktivitas enzim hidrosilase pada tahap

pembentukan kolagen, sehingga mendukung regenerasi jaringan dan memperkuat struktur kulit.<sup>21 22 4</sup>

#### 2.3.3.8 L-Histidine dan L-Serine

*L-Histidine* dan *L-Serine* berperan dalam menjaga barier kulit serta melindungi kolagen melalui mekanisme antioksidan dan antiinflamasi. *L-Histidine* berfungsi sebagai *radical scavenger* yang menetralkan ROS dan mencegah oksidasi protein kolagen, sedangkan *L-Serine* mempertahankan kelembapan kulit melalui perannya sebagai komponen *Natural Moisturizing Factor* (NMF). Keduanya juga menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK, sehingga menurunkan kadar MMP-1 dan menghambat fragmentasi kolagen. Selain melindungi, kedua asam amino ini turut menstimulasi aktivitas fibroblas dalam proses pembentukan kolagen baru, menjaga elastisitas, serta mempercepat regenerasi jaringan kulit yang rusak akibat paparan UVB.<sup>4 21 22</sup>

#### 2.3.3.9 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenolik yang terkandung dalam air kelapa muda dalam jumlah kecil namun memiliki potensi antioksidan dan antiinflamasi yang kuat. Flavonoid bekerja dengan menetralkan ROS, menghambat oksidasi lipid, serta menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK-AP-

1, yang berperan dalam kadar MMP-1. Dengan menurunkan produksi MMP-1, flavonoid membantu mencegah degradasi kolagen dermal dan inflamasi kulit akibat UVB. Selain itu, flavonoid juga dapat menstimulasi kadar gen kolagen tipe I dan III melalui aktivasi jalur TGF- $\beta$ /Smad, sehingga berperan dalam regenerasi jaringan ikat dan perbaikan struktur kulit. Oleh karena itu, meskipun bukan komponen utama, flavonoid berkontribusi secara sinergis dengan vitamin C dan sitokinin dalam perlindungan kolagen dan pencegahan *photoaging*.<sup>21 22</sup>

23

## 2.4. Sinar UV

### 2.4.1. Jenis Sinar UV

Sinar ultraviolet (UV) merupakan bagian dari spektrum elektromagnetik dengan panjang gelombang antara 100–400 nm, lebih pendek daripada cahaya tampak namun lebih panjang dari sinar-X. Berdasarkan panjang gelombangnya, sinar UV dibagi menjadi tiga jenis utama, yaitu UVA, UVB, dan UVC, yang masing-masing memiliki karakteristik fisik, tingkat energi, serta efek biologis yang berbeda terhadap jaringan hidup, khususnya kulit manusia. Ultraviolet A (UVA) memiliki panjang gelombang 320–400 nm, dengan energi paling rendah namun proporsi terbesar, yaitu sekitar 95% dari total sinar UV yang mencapai permukaan bumi. Sinar ini dapat menembus hingga lapisan dermis. Kerusakan yang ditimbulkan UVA bersifat tidak langsung,

karena disebabkan oleh stres oksidatif dan perubahan kadar gen yang berlangsung dalam jangka panjang.

Ultraviolet B (UVB) memiliki panjang gelombang 280–320 nm, dengan energi foton lebih tinggi daripada UVA namun hanya sekitar 5% yang mencapai permukaan bumi karena sebagian besar diserap oleh lapisan ozon. UVB diserap terutama oleh lapisan epidermis, sehingga efek biologisnya bersifat lebih akut dibanding UVA. Paparan UVB menyebabkan kerusakan DNA secara langsung dengan membentuk *pyrimidine dimer* (CPDs dan 6-4PPs), yang dapat memicu mutasi genetik dan respons inflamasi akut, seperti eritema (*sunburn*), edema, dan kerusakan jaringan kulit. Selain menyebabkan efek akut tersebut, UVB juga berperan dalam *photoaging* akut, yaitu perubahan morfologi dan biokimia kulit yang terjadi dalam waktu relatif singkat setelah paparan intens. Hal ini berbeda dengan UVA yang lebih sering dikaitkan dengan *photoaging* kronik akibat paparan jangka panjang. Meskipun demikian, UVB juga memiliki fungsi fisiologis penting, yaitu memicu sintesis vitamin D3 (*kolekalsiferol*) di kulit melalui konversi 7-*dehidrokolesterol* menjadi previtamin D3.

Ultraviolet C (UVC) memiliki panjang gelombang 100–280 nm dengan energi tertinggi di antara ketiganya. UVC dari matahari tidak mencapai permukaan bumi karena sepenuhnya diserap oleh lapisan ozon. Namun, UVC buatan dari lampu germisida atau merkuri digunakan sebagai alat sterilisasi dan desinfeksi, karena

kemampuannya merusak DNA dan RNA mikroorganisme. Paparan langsung terhadap sumber UVC buatan dapat menyebabkan luka bakar kulit dan fotokeratitis (kerusakan kornea akibat UV), sehingga penggunaannya harus disertai alat pelindung diri yang memadai.<sup>7</sup>

#### 2.4.2. Mekanisme Penetrasi UVB Ke Dalam Kulit

Sinar ultraviolet B (UVB) adalah radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang antara 280–320 nanometer yang memiliki energi cukup tinggi namun daya tembusnya terbatas hanya hingga lapisan epidermis kulit. Setelah mencapai permukaan kulit, sebagian besar UVB diserap oleh stratum corneum, sementara sisanya menembus ke lapisan stratum spinosum dan stratum basale, tempat sel-sel keratinosit aktif membelah. Di dalam sel, UVB diserap oleh kromofor, terutama DNA, yang menyebabkan kerusakan langsung melalui pembentukan lesi fotoproduk seperti *cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)* dan *6-4 photoproducts (6-PPs)*. Lesi ini mengganggu struktur dan replikasi DNA, dan jika tidak diperbaiki dengan baik oleh sistem perbaikan DNA seperti *nucleotide excision repair*, dapat menyebabkan mutasi pada gen penting seperti p53 yang berperan dalam kontrol siklus sel dan apoptosis. Akumulasi mutasi ini menjadi awal dari proses karsinogenesis kulit, termasuk timbulnya kanker seperti *squamous cell carcinoma* dan *basal cell carcinoma*. Selain kerusakan DNA, paparan UVB juga memicu reaksi inflamasi lokal melalui

pelepasan mediator seperti sitokin dan prostaglandin, yang menyebabkan eritema (kemerahan) dan sunburn. Tubuh juga merespon dengan meningkatkan aktivitas melanosit untuk memproduksi lebih banyak melanin sebagai upaya perlindungan adaptif. Intensitas penetrasi dan kerusakan akibat UVB dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti warna kulit (fototipe), ketebalan epidermis, kondisi kulit, dan intensitas paparan matahari.<sup>7,24</sup>

### 2.4.3. Efek Biologis UVB

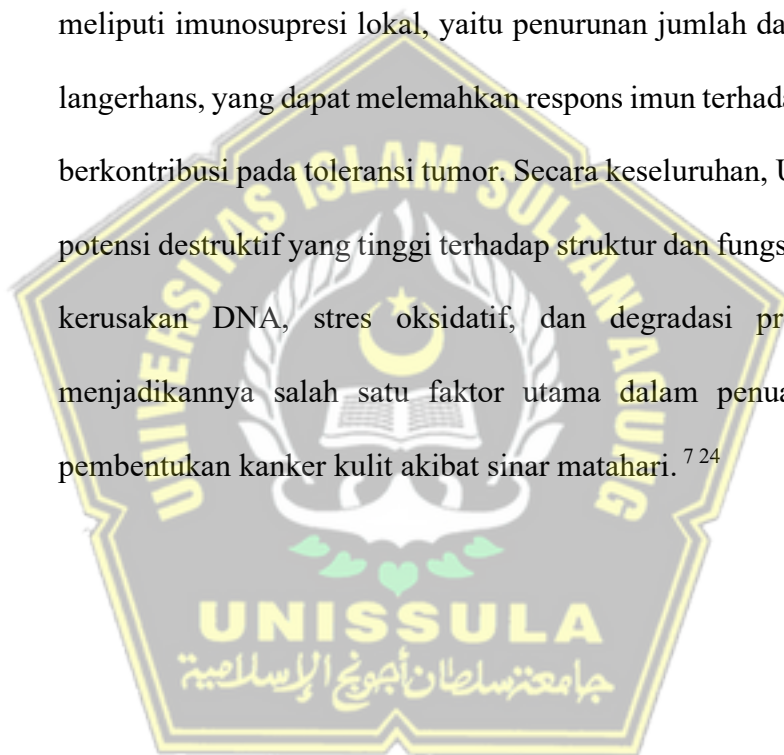
Sinar ultraviolet B (UVB) adalah radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang 280–320 nanometer yang memiliki energi tinggi dan efek biologis yang signifikan terhadap kulit. UVB terutama diserap di lapisan epidermis, khususnya *stratum spinosum* dan *stratum basale*, di mana ia menyebabkan kerusakan DNA secara langsung melalui pembentukan *cyclobutane pyrimidine dimers* (CPDs) dan 6-4 *photoproducts* (6-4PPs). Lesi DNA ini mengganggu proses replikasi dan transkripsi genetik, dan jika tidak diperbaiki secara efisien oleh mekanisme perbaikan DNA seperti *nucleotide excision repair*, dapat menyebabkan mutasi somatik pada gen-gen penting, termasuk gen p53 yang berperan dalam regulasi siklus sel dan apoptosis. Kerusakan DNA ini menjadi awal dari proses karsinogenesis kulit, termasuk perkembangan *basal cell carcinoma*, *squamous cell carcinoma*, dan dalam jangka panjang berkontribusi pada *melanoma maligna*. Sinar UVB merusak DNA, membran sel, dan protein seluler, yang kemudian

mengaktivasi sel keratinosit, fibroblas, dan sel imun kulit untuk melepaskan berbagai mediator inflamasi seperti *Interleukin-1*  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), *Interleukin-6* (IL-6), *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ). Sitokin proinflamasi ini akan mengaktivasi jalur transduksi sinyal *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) *Pathway* dan *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B).

Sinar UVB juga menginduksi stres oksidatif melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti *superoxide* ( $O_2^-$ ), *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), dan *hydroxyl radical* ( $\bullet OH$ ). Dalam kondisi fisiologis, enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *catalase* (CAT) berperan penting dalam menjaga homeostasis redoks dengan menetralkan ROS. Namun paparan UVB secara berulang menurunkan aktivitas ketiga enzim tersebut akibat peningkatan konsumsi selama proses detoksifikasi radikal bebas. Penurunan aktivitas SOD menyebabkan akumulasi superoksida, sedangkan penurunan GPx dan CAT menyebabkan peningkatan kadar hidrogen peroksida yang tidak terurai. Kondisi ini memperparah stres oksidatif yang kemudian mengaktivasi jalur pensinyalan intraseluler seperti *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) *Pathway* dan *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B).

MAPK akan mengaktivasi *Activator Protein-1* (AP-1). Aktivasi AP-1 meningkatkan kadar *matrix metalloproteinases* (MMPs),

terutama MMP-1. NF- $\kappa$ B juga dapat meningkatkan transkripsi MMP-1, dimana enzim ini berperan dalam degradasi kolagen tipe I dan III, komponen utama matriks ekstraselular di dermis. Dampaknya adalah kerusakan jaringan ikat kulit, yang secara klinis ditandai dengan penurunan elastisitas, munculnya kerutan, dan hilangnya struktur kulit, suatu proses yang dikenal sebagai photoaging. Efek biologis lainnya meliputi immunosupresi lokal, yaitu penurunan jumlah dan aktivitas sel langerhans, yang dapat melemahkan respons imun terhadap antigen dan berkontribusi pada toleransi tumor. Secara keseluruhan, UVB memiliki potensi destruktif yang tinggi terhadap struktur dan fungsi kulit melalui kerusakan DNA, stres oksidatif, dan degradasi protein dermis, menjadikannya salah satu faktor utama dalam penuaan kulit dan pembentukan kanker kulit akibat sinar matahari.<sup>7 24</sup>



## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Teori

Sinar UVB memiliki panjang gelombang 290–320 nm dengan energi foton yang tinggi sehingga mampu menembus lapisan epidermis hingga dermis bagian atas. Paparan UVB dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA, membran sel, dan protein seluler, yang selanjutnya mengaktifasi sel keratinosit, fibroblas, dan sel imun kulit untuk melepaskan berbagai mediator inflamasi seperti *interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), *interleukin-6* (IL-6), dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ). Pelepasan sitokin proinflamasi tersebut berperan dalam mengaktifasi jalur transduksi sinyal MAPK dan NF- $\kappa$ B. Selain menimbulkan respon inflamasi, paparan UVB juga menginduksi stres oksidatif melalui pembentukan ROS seperti *superoxide* (O $_2^-$ ), *hydrogen peroxide* (H $_2$ O $_2$ ), dan *hydroxyl radical* ( $\bullet$ OH). Dalam kondisi fisiologis, ROS dikendalikan oleh sistem pertahanan antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *catalase* (CAT) yang menjaga keseimbangan redoks di dalam sel. Namun, paparan UVB yang berulang mengakibatkan penurunan aktivitas enzim-enzim tersebut akibat peningkatan konsumsi selama proses detoksifikasi radikal bebas, sehingga terjadi akumulasi ROS.<sup>2 14</sup>

Akumulasi ROS akan mengaktifasi jalur MAPK yang kemudian menstimulasi pembentukan AP-1 yang dapat mengikat promotor gen *matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) dan meningkatkan transkripsinya. Selain itu

ROS juga dapat mengaktifkan NF- $\kappa$ B yang dapat memicu transkripsi gen MMP-1. ROS bertindak sebagai sinyal second messenger yang memperkuat respon inflamasi terhadap sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  sehingga semakin meningkatkan produksi enzim MMP-1, yaitu enzim proteolitik yang berperan dalam degradasi kolagen yang merupakan komponen utama matriks dermis, menghasilkan fragmentasi kolagen yang selanjutnya bertindak sebagai *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Fragmen kolagen tersebut mengaktifasi kembali jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK, yang memicu pelepasan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) dan memperkuat siklus patologis antara inflamasi kronis dan kerusakan kolagen yang berulang.<sup>2 11</sup>

*Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) merupakan sitokin utama yang berperan dalam regulasi sintesis kolagen melalui aktivasi jalur TGF- $\beta$ /Smad. Pada kondisi fisiologis, TGF- $\beta$  berikatan dengan reseptornya (T $\beta$ RII dan T $\beta$ RI), kemudian memfosforilasi Smad2/3 yang berikatan dengan Smad4 untuk masuk ke inti dan menginduksi transkripsi gen kolagen COL1A1, COL1A2, COL3A1. Namun, paparan sinar UVB terbukti dapat menekan jalur ini melalui induksi stres oksidatif dan aktivasi jalur MAPK yang selanjutnya meningkatkan kadar faktor transkripsi AP-1. Aktivasi AP-1 menghambat kadar T $\beta$ RII pada fibroblas dermal sehingga mengurangi aktivasi Smad2/3. Akibatnya, sintesis kolagen baru menurun secara signifikan. Selain itu, Sinar UVB menginduksi Smad7 (*inhibitory Smad*) melalui aktivasi AP-1. Smad7 bekerja menghambat fosforilasi Smad2/3 dan memfasilitasi degradasi reseptor TGF- $\beta$  sehingga respons prokolagen semakin tertekan.<sup>13</sup>

Air kelapa muda berpotensi besar sebagai agen alami yang mampu menekan proses stres oksidatif dan inflamasi akibat paparan UVB. Air kelapa muda mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti vitamin C, *L-arginine*, *L-methionine*, sitokinin, selenium, flavonoid, serta mineral mikro seperti magnesium (Mg), seng (Zn), dan mangan (Mn). Kombinasi senyawa ini berperan secara sinergis sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan stimulator sintesis kolagen dermis. Vitamin C pada air kelapa muda merupakan antioksidan kuat yang mendonorkan elektron untuk menetralkan ROS, sekaligus berfungsi sebagai kofaktor enzim *prolyl dan lysyl hydroxylase* yang berperan dalam tahap hidroksilasi prolin dan lisin pada pembentukan kolagen. Dengan menekan ROS, vitamin C dapat menghambat aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK-AP-1. Sehingga menurunkan kadar MMP-1 dan memperkuat struktur kolagen dermis.<sup>4 22</sup>

*L-arginine* dalam air kelapa muda merupakan prekursor *nitric oxide* (NO), yang membantu meningkatkan aktivitas enzim SOD dan GPx dalam menetralkan ROS. sehingga dapat menekan aktivasi MAPK-AP 1 dan NF- $\kappa$ B. *L-arginine* juga dapat mensintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ . Demikian pula, *L-methionine* berperan dalam pembentukan *glutathione* (GSH), senyawa antioksidan endogen yang dapat menetralkan ROS sehingga mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK. Selain itu, methionine juga berfungsi dalam pembentukan *S-adenosylmethionine* (SAM) yang mengatur kadar gen kolagen melalui metilasi DNA.<sup>4 22</sup>

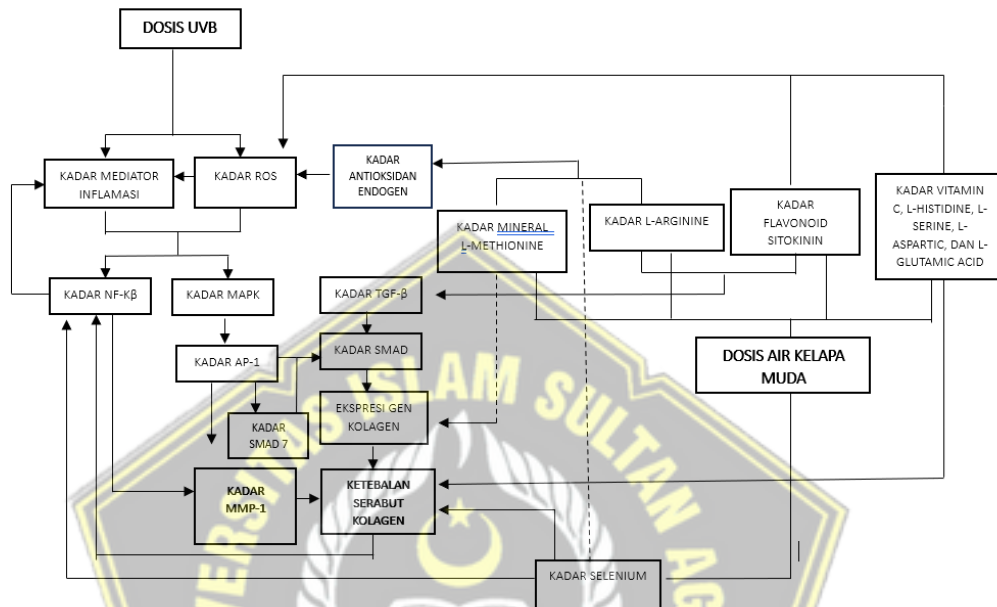
Sitokinin dalam air kelapa muda merupakan hormon alami tumbuhan yang memiliki aktivitas anti-aging dengan cara menghambat pembentukan

ROS, mencegah apoptosis fibroblas, dan mensintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ . Selenium sebagai komponen enzim *glutathione peroxidase* (GPx) juga penting dalam mengurangi akumulasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan lipid peroksida, sehingga mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK. Sementara itu, mineral seperti Mg, Zn, dan Mn berperan sebagai kofaktor enzim antioksidan (Cu/Zn-SOD dan Mn-SOD) yang melindungi sel dari stres oksidatif dan meningkatkan transkripsi gen kolagen.<sup>4 22</sup>

Selain komponen utama tersebut, air kelapa muda juga mengandung asam amino seperti *L-aspartic acid*, *L-glutamic acid*, *L-histidine*, dan *L-serine* yang berperan sebagai antioksidan ringan, penyeimbang pH intrasel, dan pendukung metabolisme energi fibroblas. Senyawa-senyawa ini turut menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK serta meningkatkan sintesis kolagen. Flavonoid dalam air kelapa muda juga berkontribusi dalam perlindungan kulit melalui mekanisme penghambatan oksidasi lipid, penurunan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK-AP-1, serta stimulasi jalur TGF- $\beta$ /Smad yang berperan dalam kadar gen kolagen.<sup>4 22</sup>

Secara keseluruhan, paparan UVB meningkatkan produksi ROS dan sitokin proinflamasi yang mengaktivasi jalur MAPK dan NF- $\kappa$ B, menyebabkan peningkatan kadar MMP-1 dan degradasi kolagen dermis yang berujung pada *photoaging*. Kandungan bioaktif dalam air kelapa muda bekerja secara sinergis untuk menetralkan ROS, menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK, serta berperan dalam sintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ /Smad dan aktivitas enzim hidrosilase yang penting dalam pembentukan struktur

kolagen. Dengan demikian, air kelapa muda memiliki potensi sebagai agen alami yang mampu berpengaruh terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit yang dipapar sinar UVB. <sup>4 22</sup>



Gambar 3.1. Kerangka Teori

### 3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

### 3.3 Hipotesis

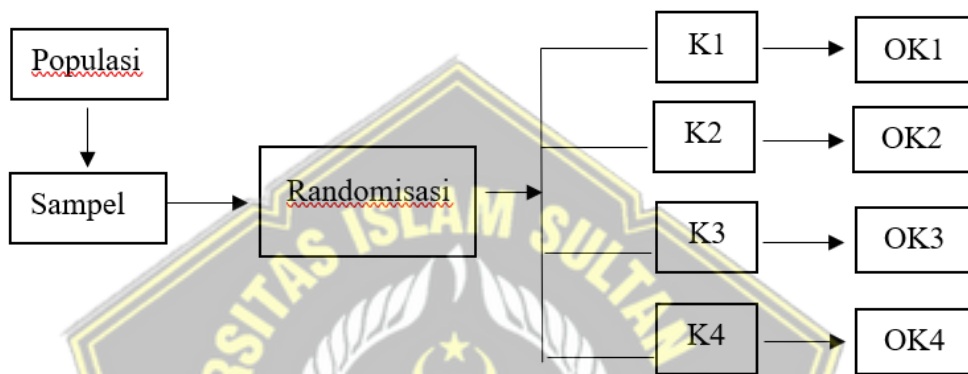
Pemberian air kelapa muda secara oral mempengaruhi kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang dipapar sinar UVB.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni dengan rancangan *post test only control group design* pada tikus jantan galur wistar



**Gambar 4.1. Desain Penelitian**

- K1 : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar serta minum *ad libitum* dan tidak dipapar sinar UVB (kelompok sehat)
- K2 : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar, minum *ad libitum*, serta air putih biasa dengan sonde dan dipapar sinar UVB selama 15 hari (kelompok kontrol negatif)
- K3 : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar, minum *ad libitum* serta air kelapa muda dengan sonde dosis 4mL/200g BB/hari dan dipapar sinar UVB selama 15 hari
- K4 : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar, minum *ad libitum* serta air kelapa muda dengan sonde dosis

8mL/200g BB/hari (dibagi 2 dosis pagi dan siang) dan dipapar sinar UVB selama 15 hari

- O-K1 : pengukuran jumlah kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kelompok sehat pada hari ke-16
- O-K2 : pengukuran jumlah kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kelompok kontrol negatif pada hari ke-16
- O-K3 : pengukuran jumlah kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kelompok perlakuan setelah pemberian air kelapa muda dengan sonde 4mL/200g pada hari ke-16
- O-K4 : pengukuran jumlah kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kelompok perlakuan setelah pemberian air kelapa muda dengan sonde 8mL/200g (dibagi 2 dosis pagi dan siang) pada hari ke-16

## **4.2. Populasi dan Sampel Penelitian**

### **4.2.1. Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan usia  $\pm 2$  bulan, berat badan 150-200 gram, yang diperoleh dari Kabupaten Karanganyar

### **4.2.2. Sampel**

Sampel pada penelitian ini sebanyak 24 ekor tikus, yang mana masing masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Peneliti mengacu pada WHO yakni besar sampel minimal hewan coba untuk penelitian

sebanyak 5 ekor dengan menambahkan masing masing 1 ekor pada setiap kelompok sebagai perkiraan dropout.

#### 4.2.3. Teknik Sampling

Strategi pengambilan sampel pada penelitian ini adalah dengan cara *simple random sampling*. Teknik ini digunakan untuk membagi 24 ekor tikus menjadi 4 kelompok yakni dua kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan

##### 4.2.3.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan galur wistar
2. Berat badan tikus 150-200 gram
3. Tikus dalam keadaan sehat, berperilaku normal, dan bergerak aktif
4. Usia  $\pm 2$  bulan

##### 4.2.3.2. Drop Out

Tikus yang sakit atau mati selama penelitian

#### 4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

##### 4.3.1. Variabel Penelitian

###### 4.3.1.1. Variabel Bebas

Pemberian air kelapa muda secara oral

###### 4.3.1.2. Variabel Antara

Kadar MMP-1

###### 4.3.1.3. Variabel Tergantung

Ketebalan Serabut Kolagen

### 4.3.2. Definisi Operasional

#### 4.3.2.1 Air Kelapa Muda

Air kelapa muda berasal dari buah Kelapa Hijau Wulung (*Cocos nucifera var. viridis*), usia sekitar 5–7 bulan, dengan ciri-ciri kulit buah berwarna hijau, daging lembek transparan, air jernih dan manis. Dosis air kelapa muda yang diberikan pada kelompok perlakuan pertama yaitu 4mL/200g BB/hari. Pada kelompok perlakuan kedua yaitu 8mL/200g BB/hari dibagi dalam 2 dosis pagi dan siang selama 15 hari berturut-turut dan diberikan secara oral menggunakan sonde.<sup>4</sup>

**Skala data : Ordinal**

#### 4.3.2.2 Kadar MMP-1

Kadar MMP-1 diukur menggunakan teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dari sampel serum yang diperoleh melalui pengambilan darah dari *sinus orbita* tikus putih jantan galur Wistar dan dinyatakan dalam satuan ng/mL.<sup>25</sup>

**Skala data : Rasio**

#### 4.3.2.3 Ketebalan Serabut Kolagen

Ketebalan serabut kolagen dalam penelitian ini diukur dari jaringan dermis kulit punggung tikus jantan galur Wistar yang telah diwarnai menggunakan pewarnaan *Masson's Trichrome*. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop

cahaya dengan perbesaran 40×. Pengukuran ketebalan serabut kolagen dilakukan menggunakan ocular micrometer yang telah dikalibrasi dengan stage micrometer. Pengukuran dilakukan pada lima bidang pandang acak representatif di area dermis, kemudian dirata-ratakan untuk mendapatkan nilai ketebalan serabut kolagen per sampel, dinyatakan dalam satuan mikrometer ( $\mu\text{m}$ ).<sup>26 27</sup>

#### **Skala Data : Rasio**

#### **4.4. Instrumen dan Bahan Penelitian**

##### **4.4.1. Instrumen Penelitian**

1. Kandang hewan coba dengan ventilasi baik.
2. Timbangan digital hewan coba
3. Spuit 1 cc dengan sonde oral untuk pemberian air kelapa muda.
4. lampu TL UVB *fluorescent high output* tipe FS72T12 ballast Philips 125 watt
5. Alat bedah kecil (gunting, pinset, dan skalpel).
6. Mikrotom untuk pemotongan jaringan parafin.
7. Alat *tissue processing* (rak dehidrasi, clearing, dan infiltrasi).
8. Alat *embedding* (cetakan parafin, pendingin embedding).
9. *Hot plate* / inkubator slide untuk pemanasan kaca objek.
10. Mikroskop cahaya.
11. Kaca objek dan cover slip berlapis perekat (*poly-L-lysine*).

12. Wadah spesimen dan botol reagen.
13. *Microplate ELISA 96-well*
14. *Micropipette (single & multichannel) + tip steril*
15. *Microplate reader (450 nm)*
16. *Microplate washer*
17. *Centrifuge*
18. *Vortex mixer*
19. Inkubator / suhu ruang terkontrol
20. Refrigerator (2–8°C) dan freezer
21. *Ocular micrometer*
22. *Stage micrometer*

#### 4.4.2. Bahan Penelitian

1. Tikus jantan galur Wistar usia  $\pm 2$  bulan, berat 150–200 gram, sebanyak 24 ekor.
2. Pakan standar AD-II dan air minum *ad libitum*.
3. Anestesi ketamin injeksi
4. Air kelapa muda Wulung
5. Air putih biasa
6. Larutan NaCl fisiologis (0,9%).
7. Formalin buffer netral 10% (fiksasi).
8. Alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) untuk dehidrasi.
9. Xylol / toluene (clearing).
10. Parafin blok (56–60°C) untuk infiltrasi dan embedding.
11. Reagen *Masson's Trichrome* untuk pewarnaan kolagen, terdiri atas:

- a. Larutan hematoxylin (nuclear stain).
  - b. *Biebrich scarlet–acid fuchsin*.
  - c. *Fosfotungstat acid* dan *fosfomolibdat acid* (differentiator).
  - d. *Aniline blue* atau *light green* (pewarnaan kolagen).
12. Aquadest .
  13. Mounting medium (*Distrene Plasticizer Xylene*)
  14. Mouse MMP-1 ELISA kit
  15. Larutan standar MMP-1
  16. Antibodi penangkap (*coated plate*)
  17. Antibodi deteksi berkonjugasi enzim *horseradish peroxidase*
  18. Substrat *tetramethylbenzidine*
  19. Stop solution
  20. Wash buffer
  21. Sample diluent

#### 4.5. Cara Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen murni dengan rancangan *post-test only control group design* yang melibatkan 24 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) usia  $\pm 2$  bulan dengan berat badan 150–200 gram. Prosedur dilakukan sebagai berikut:

##### 4.5.1. Adaptasi Hewan Coba

Seluruh tikus dikondisikan di laboratorium hewan selama 7 hari untuk proses adaptasi, diberi pakan standar dan air minum *ad libitum*, serta dipelihara dalam kondisi kandang yang bersih dan berventilasi baik.

#### 4.5.2. Perlakuan dan Pembagian Kelompok

Sebanyak 24 ekor tikus putih jantan galur wistar dibagi menjadi 4 kelompok secara random dan setiap kelompok terdiri dari 6 ekor, pembagian kelompok sebagai berikut :

1. Kelompok Satu (K1) : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar serta minum *ad libitum* dan tidak dipapar sinar UVB;
2. Kelompok Dua (K2) : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar serta minum *ad libitum* serta air putih biasa dengan sonde dan dipapar sinar UVB dalam 15 hari
3. Kelompok Tiga (K3) : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar, *minum ad libitum* serta air kelapa muda dengan sonde dosis 4mL/200g BB/hari dan dipapar sinar UVB selama 15 hari.
4. Kelompok Empat (K4) : tikus putih jantan galur wistar yang mendapatkan diet pakan standar, minum *ad libitum* serta air kelapa muda dengan sonde dosis 8mL/200g BB/hari (dibagi dua dosis pagi dan siang) dan dipapar sinar UVB selama 15 hari.

#### 4.5.3. Pemberian Air Kelapa Muda

Air kelapa muda berasal dari buah Kelapa Hijau Wulung (*Cocos nucifera var. viridis*), usia sekitar 5–7 bulan. Pada fase ini daging buah masih lunak dan kandungan airnya berada pada jumlah serta kualitas optimal. Ciri fisik kelapa hijau wulung ditandai dengan kulit buah

berwarna hijau tua keunguan, aroma segar khas kelapa muda, dan rasa air yang manis alami. Air kelapa muda diperoleh langsung dari buah yang baru dibuka setiap hari untuk menjaga kestabilan kandungan nutrisinya. Dosis air kelapa muda yang diberikan pada kelompok perlakuan pertama yaitu 4mL/200g BB/hari. Pada kelompok perlakuan kedua yaitu 8mL/200g BB/hari dibagi dalam 2 dosis pagi dan siang selama 15 hari berturut-turut dan diberikan secara oral menggunakan sonde. Pemberiannya bersamaan dengan paparan sinar UVB. <sup>4</sup>

#### 4.5.4. Paparan Sinar UVB

Paparan sinar UVB diberikan pada kelompok dua, tiga, dan empat menggunakan lampu TL UVB *fluorescent high output* tipe FS72T12 yang dioperasikan dengan ballast Philips 125 watt, dengan jarak penyinaran 20 cm. Dosis tiap paparan 1 MED (100 mJ/cm<sup>2</sup>) selama 10 menit dilakukan dua hari sekali selama 15 hari, yaitu pada hari ke-1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, dan 15, dengan total kumulatif paparan sebesar 800 mJ/cm<sup>2</sup>. <sup>12</sup>

#### 4.5.5. Pemeriksaan Ketebalan Serabut Kolagen

##### 4.5.5.1 Pengambilan Sampel Jaringan

Pada hari ke-16 (24 jam setelah penyinaran terakhir), seluruh tikus dianestesi dengan ketamin dosis tinggi (100 mg/kgBB intraperitoneal) hingga kondisi eutanasia. Jaringan

kulit dorsal dibersihkan dari rambut dan diambil berukuran  $\pm 1 \times 1 \text{ cm}^2$  untuk analisis.<sup>28 29</sup>

#### 4.5.5.2 Fiksasi<sup>28 29</sup>

Sampel jaringan dimasukkan ke dalam formalin buffer netral 10% selama  $\pm 24-48$  jam. Tujuannya untuk mempertahankan struktur morfologi jaringan dan stabilitas protein.

#### 4.5.5.3 Proses Jaringan (Tissue Processing)<sup>28 29</sup>

- a. Dehidrasi : jaringan dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) untuk menghilangkan air.
- b. Clearing : alkohol diganti dengan xylol/toluene agar jaringan transparan dan siap ditembusi parafin.
- c. Infiltrasi : jaringan dimasukkan ke parafin cair ( $56-60^\circ\text{C}$ ).

#### 4.5.5.4 Embedding<sup>28 29</sup>

- a. Jaringan yang telah melalui infiltrasi dimasukkan ke dalam cetakan berisi parafin cair.
- b. Orientasi jaringan harus diperhatikan (misalnya permukaan kulit menghadap ke atas agar epidermis terlihat jelas).
- c. Setelah posisi benar, cetakan segera ditaruh di atas *cold plate* / pendingin embedding. Bertujuan untuk membekukan parafin dengan cepat sehingga jaringan

tertanam stabil, menjaga agar orientasi jaringan tidak bergeser, dan menghasilkan blok parafin yang keras dan homogen, sehingga mudah dipotong dengan mikrotom.

#### 4.5.5.5 Pemotongan (*Sectioning*)<sup>28 29</sup>

- a. Blok parafin dipotong dengan mikrotom setebal 4–5  $\mu\text{m}$ .
- b. Potongan diletakkan di atas kaca objek berlapis perekat (poly-L-lysine).

#### 4.5.5.6 Pemanasan<sup>28 29</sup>

Slide diletakkan di atas *hot plate*/inkubator slide (37–60°C) selama  $\pm 30$ –60 menit untuk memastikan jaringan menempel kuat pada kaca objek dan menguapkan sisa air/parafin tipis.

#### 4.5.5.7 Pewarnaan Kolagen (*Masson's Trichrome*)<sup>29 26</sup>

- a. Deparafinisasi & Rehidrasi

Proses ini dilakukan dengan merendam slide jaringan ke dalam xylol/toluene secara berulang untuk melarutkan dan menghilangkan parafin yang masih menyelimuti jaringan. Penghilangan parafin sangat penting karena sisa parafin dapat menghalangi penetrasi reagen pewarna, sehingga hasil pewarnaan menjadi tidak optimal.

Setelah deparafinisasi selesai, jaringan dilanjutkan dengan proses rehidrasi, yaitu perendaman bertahap ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi menurun

(100%, 96%, 90%, 80%, 70%) hingga akhirnya dibilas dengan aquadest. Tahap rehidrasi bertujuan untuk mengembalikan jaringan ke kondisi hidrofilik (berair) sehingga jaringan siap menerima larutan pewarna berbasis air pada tahap berikutnya, seperti Hematoxylin, *Biebrich Scarlet – Acid Fuchsin*, dan *Aniline Blue* atau *Light Green*

b. Pewarnaan inti (Nukleus)

Rendam dengan *Weigert's Hematoxylin*, inti berwarna biru/kehitaman.

c. Cuci dengan air

Menghilangkan sisa pewarna yang tidak terikat.

d. Pewarnaan sitoplasma & otot

Rendam dengan *Biebrich Scarlet–Acid Fuchsin*, sitoplasma, otot, dan eritrosit berwarna merah.

e. Cuci dengan air

Menghilangkan sisa pewarna yang tidak terikat.

f. Diferensiasi (Pemisahan)

Gunakan *fosfotungstat* - *fosfomolibdat*, menghilangkan warna merah dari kolagen.

g. Pewarnaan Kolagen

Rendam dengan *Aniline Blue* atau *Light Green*, kolagen berwarna biru/hijau.

h. Cuci dengan air

Menghilangkan sisa pewarna yang tidak terikat.

- i. Rendam dalam larutan asam asetat 1%

Untuk memastikan warna tetap stabil.

- j. Dehidrasi

Rendam bertahap dalam alcohol (70%-100%)  
untuk mengeluarkan air.

- k. Clearing

Gunakan xylol untuk membuat jaringan  
transparan.

1. Mounting & Observasi

Teteskan mounting medium (*Distrene Plasticizer Xylene*) pada preparate lalu ditutup dengan kaca penutup,  
diamati menggunakan mikroskop cahaya.

#### 4.5.5.8 Pemeriksaan Histologis

##### 1. Pengukuran Ketebalan Serabut Kolagen<sup>26 27</sup>

- a. Gunakan sediaan jaringan yang sudah dilakukan  
pewarnaan *Masson's Trichome*
- b. Amati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran  
40x
- c. Kalibrasi Mikrometer
  - Sebelum pengukuran dilakukan, mikroskop  
dikalibrasi menggunakan *stage micrometer*  
dengan interval 0,01 mm (10  $\mu$ m per divisi).

- Skala pada *ocular micrometer* disesuaikan dengan skala *stage micrometer* untuk menentukan faktor konversi ( $\mu\text{m}$  per satuan okuler) pada pembesaran 40x.
- Faktor konversi yang diperoleh dicatat dan digunakan untuk seluruh pengukuran pada pembesaran yang sama.

d. Pemilihan Bidang Pandang

- Dari setiap potongan jaringan, dipilih lima bidang pandang acak di area dermis (papiler dan retikuler) menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 40 $\times$ .
- Bidang yang mengandung artefak seperti lipatan, robekan, atau area yang tidak rata tidak diikutsertakan dalam pengamatan.
- Pencahayaan mikroskop dijaga konstan untuk seluruh proses pengukuran.

e. Pengukuran Ketebalan Serabut Kolagen

- Pada setiap bidang pandang, dipilih 1 serabut kolagen yang terpotong tegak lurus terhadap bidang potong (bukan miring atau tangensial).
- Garis pengukur pada *ocular micrometer* ditempatkan tepat pada tepi luar serabut kolagen,

dan panjang serabut yang melintang diukur dalam satuan ocular unit.

- Nilai pengukuran dikonversi menjadi mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) menggunakan faktor kalibrasi yang telah ditentukan.
- Total diperoleh 5 pengukuran per sampel.
- Hasil akhir untuk setiap sampel berupa rata-rata ketebalan serabut kolagen ( $\mu\text{m}$ ) dari seluruh pengukuran.

#### 4.5.6. Pemeriksaan Kadar MMP-1

- Sampel darah diambil dari tikus melalui *sinus orbital*
- Darah dimasukkan ke dalam tabung tanpa antikoagulan.
- Sampel darah didiamkan selama  $\pm 30$  menit pada suhu ruang hingga terjadi koagulasi.
- Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan  $\pm 3000$  rpm selama 10–15 menit untuk memisahkan serum.
- Serum yang diperoleh dipindahkan ke mikro-tube bersih dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dilakukan pemeriksaan.
- Semua reagen dan sampel dibiarkan mencapai suhu ruang ( $20$ – $25^{\circ}\text{C}$ ) sebelum digunakan.
- Larutan standar MMP-1 disiapkan dengan pengenceran bertingkat sesuai petunjuk kit.
- Sebanyak  $50 \mu\text{L}$  larutan standar dan  $40 \mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke

dalam masing-masing sumur microplate.

- Ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  antibodi deteksi *biotinylated* ke sumur sampel.
- Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  larutan *streptavidin-Horseradish Peroxidase* ke setiap sumur.
- Plate diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit.
- Plate dicuci kembali sebanyak 5 kali.
- Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  substrat *tetramethylbenzidine* ke setiap sumur.
- Plate diinkubasi dalam kondisi gelap selama 15–20 menit hingga terbentuk warna biru.
- Reaksi dihentikan dengan penambahan 50  $\mu\text{L}$  stop solution, sehingga warna berubah menjadi kuning.
- Absorbansi dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.
- Kurva standar dibuat berdasarkan nilai absorbansi larutan standar.
- Konsentrasi MMP-1 dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar.
- Hasil dinyatakan dalam satuan  $\text{ng/mL}$ .<sup>25</sup>

#### 4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

##### 4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Integrated Biomedical Laboratories* Fakultas Kedokteran UNISSULA, untuk proses pemeliharaan hewan coba, adaptasi, pemberian perlakuan, dan pajanan sinar UVB. Laboratorium CITO untuk proses pengambilan darah dan

pemeriksaan kadar MMP-1 menggunakan metode ELISA. Pengambilan jaringan kulit, pembuatan preparat, serta pemeriksaan ketebalan serabut kolagen dengan pewarnaan *Masson's Trichome*.

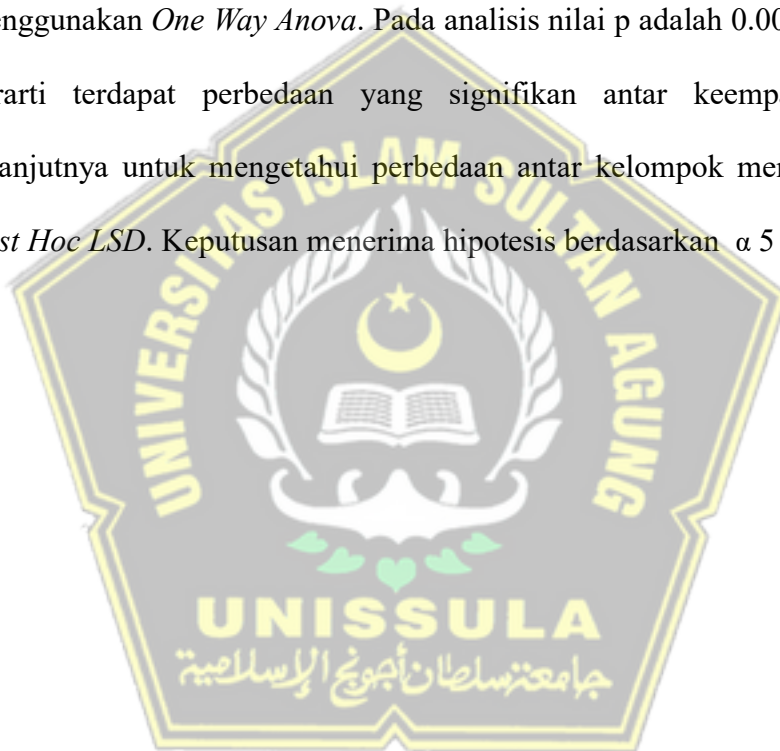
#### 4.6.2. Waktu Penelitian

Waktu yang diperlukan pada studi ini adalah 30 hari, yang dilakukan pada bulan Oktober 2025 mencakup tahap adaptasi hewan coba, perlakuan selama 15 hari, pengambilan sampel jaringan, hingga analisis laboratorium.





dan uji homogenitas menggunakan Uji *Leuvene test*. Hasil data kadar MMP-1 tidak berdistribusi normal dan homogen maka analisis menggunakan *Kruskal Wallis*. Pada analisis nilai p adalah 0.001 atau  $p < 0.05$  berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar keempat kelompok, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok menggunakan uji *Mann Whitney*. Hasil data Ketebalan Serabut Kolagen berdistribusi normal dan homogen maka analisis menggunakan *One Way Anova*. Pada analisis nilai p adalah 0.001 atau  $p < 0.05$  berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar keempat kelompok, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok menggunakan uji *Post Hoc LSD*. Keputusan menerima hipotesis berdasarkan  $\alpha 5 \%$ .<sup>30</sup>



## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Penelitian

Penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian air kelapa muda terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada tikus jantan galur Wistar yang dipapar sinar UVB telah dilakukan. Hasil perlakuan tersebut ditampilkan pada table 5.1.

**Tabel 5.1.** Hasil Analisis Rerata Kadar MMP-1, dan Ketebalan Serabut Kolagen pada Kelompok K1, K2, K3, K4

Variabel	KELOMPOK				Sig (p)
	K1	K2	K3	K4	
	N=6 Rerata	N=6 Rerata	N=6 Rerata	N=6 Rerata	
<b>Kadar MMP-1 (ng/mL)</b>	<b>4.926</b>	<b>6.615</b>	<b>4.435</b>	<b>4.955</b>	
<i>Std. deviasi</i>	0.072	0.162	0.278	0.028	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.051	0.029	0.001	0.457	
<i>Levene Test</i>					0.081
<i>Kruskal Wallis</i>					0.001
<b>Ketebalan Serabut Kolagen (µm)</b>	<b>27.700</b>	<b>18.100</b>	<b>35.866</b>	<b>30.700</b>	
<i>Std. deviasi</i>	5.370	4.684	6.549	8.295	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.281	0.091	0.992	0.218	
<i>Levene Test</i>					0.402
<i>Anova</i>					0.001

Keterangan :

K1 : kelompok tikus tanpa paparan sinar UVB (kelompok sehat)

K2 : kelompok tikus dengan paparan sinar UVB, mendapatkan air putih biasa melalui sonde

K3 : kelompok tikus dengan paparan sinar UVB, mendapatkan air kelapa muda 4 mL/200gBB/hari melalui sonde

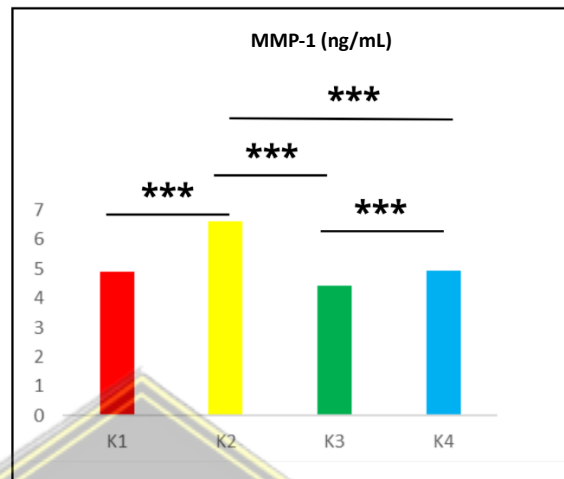
K4 : kelompok tikus dengan paparan sinar UVB, mendapatkan air kelapa muda 8 mL/200gBB/hari melalui sonde

### 5.1.1 Kadar MMP-1

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar MMP-1 terendah didapatkan pada kelompok perlakuan 1 (K3) ( $4.435 \pm 0,278$  ng/mL), kemudian disusul kelompok normal (K1) ( $4.926 \pm 0.072$  ng/mL), kemudian disusul kelompok perlakuan 2 (K4) ( $4.955 \pm 0.028$  ng/mL), kemudian disusul kelompok paparan UVB (K2) ( $6.615 \pm 0.162$  ng/mL). Rerata kadar MMP-1 tertinggi ditemukan pada kelompok yang diberikan paparan UVB (K2) ( $6.615 \pm 0.162$  ng/mL). Uji normalitas dengan *shapiro wilk* menyatakan data tidak berdistribusi normal ( $p < 0.05$ ). Hasil analisis homogenitas dengan uji *levene test* menunjukkan hasil homogen ( $p > 0,05$ ). Karena data berdistribusi tidak normal dan maka dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk menilai perbedaan antar kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna antara empat kelompok ( $p = 0,001$ ). Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan dilakukan uji *Mann Whitney*.

Hasil uji *Man Whitney* pada semua kelompok digambarkan pada Gambar 5.1 dan Tabel 5.2. Hasil uji *Man Whitney* kadar MMP-1 menunjukkan bahwa K1 dengan K2 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). K2 dengan K3 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ). K2 dengan K4 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). K3 dengan K4 menunjukkan perbedaan signifikan ( $P < 0.05$ ). K1 dengan K3 tidak memiliki perbedaan signifikan ( $p > 0.05$ ). K1 dengan K4 tidak memiliki

perbedaan signifikan ( $p > 0.05$ ).



**Gambar 5.1.** Perbedaan Rerata Kadar MMP-1 Antar Kelompok  
Keterangan: \*\*\* signifikan

**Tabel 5.2.** Perebedaan rerata kadar MMP-1 antar 2 kelompok dengan uji *Man Whitney*

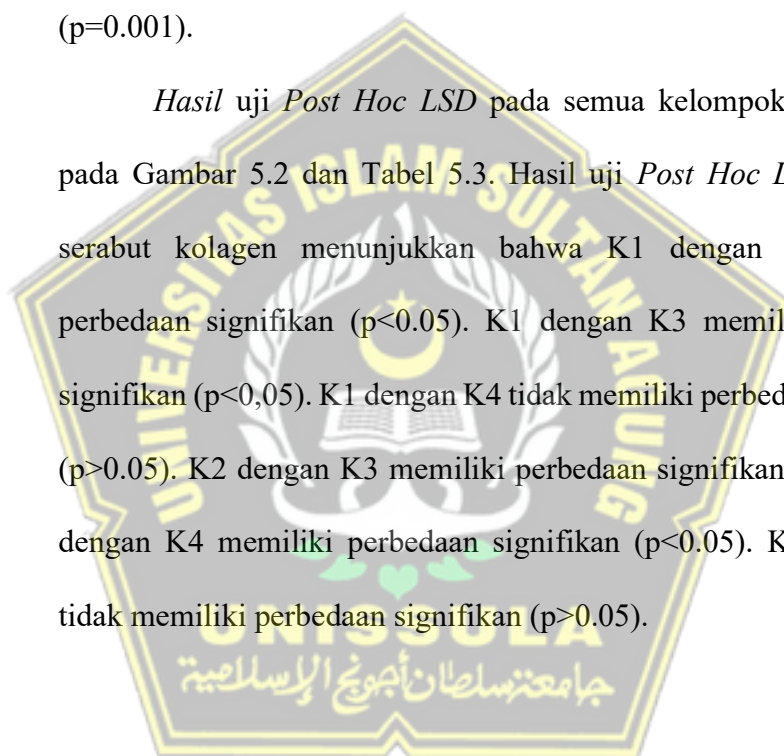
	K1	K2	K3	K4
K1		0.004	0.054	0.872
K2			0.004	0.004
K3				0.044
K4				

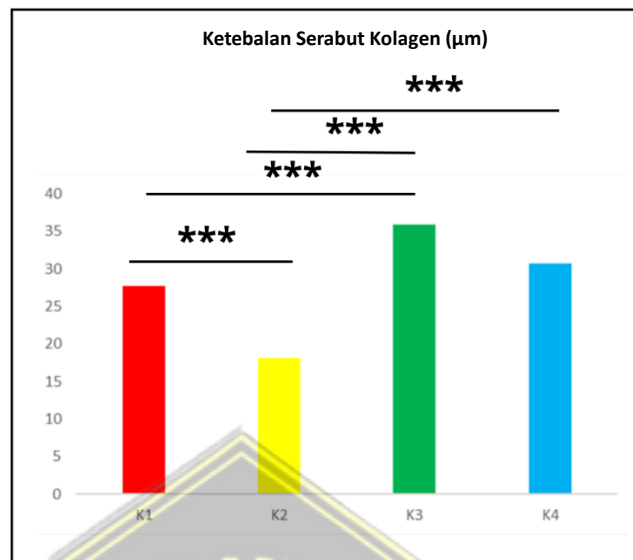
### 5.1.2. Ketebalan Serabut Kolagen

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ketebalan serabut kolagen tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan 1 (K3) ( $35.866 \pm 6.549 \mu\text{m}$ ), kemudian disusul kelompok perlakuan 2 (K4) ( $30.700 \pm 8.295 \mu\text{m}$ ), kemudian disusul kelompok normal (K1) ( $27.700 \pm 5.370 \mu\text{m}$ ), kemudian disusul kelompok paparan UVB (K1) ( $18.100 \pm 4.684 \mu\text{m}$ ). Uji normalitas dengan *shapiro wilk* menyatakan semua kelompok

berdistribusi normal ( $p > 0.05$ ). Hasil analisis homogenitas dengan uji *levene test* menunjukkan hasil homogen ( $p > 0.05$ ). Karena data berdistribusi normal dan homogen maka dianalisis menggunakan *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk menilai perbedaan antar kelompok. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan didapatkan perbedaan yang signifikan antara empat kelompok ( $p = 0.001$ ).

*Hasil uji Post Hoc LSD* pada semua kelompok digambarkan pada Gambar 5.2 dan Tabel 5.3. Hasil uji *Post Hoc LSD* ketebalan serabut kolagen menunjukkan bahwa K1 dengan K2 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). K1 dengan K3 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). K1 dengan K4 tidak memiliki perbedaan signifikan ( $p > 0.05$ ). K2 dengan K3 memiliki perbedaan signifikan ( $P < 0.05$ ). K2 dengan K4 memiliki perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). K3 dengan K4 tidak memiliki perbedaan signifikan ( $p > 0.05$ ).



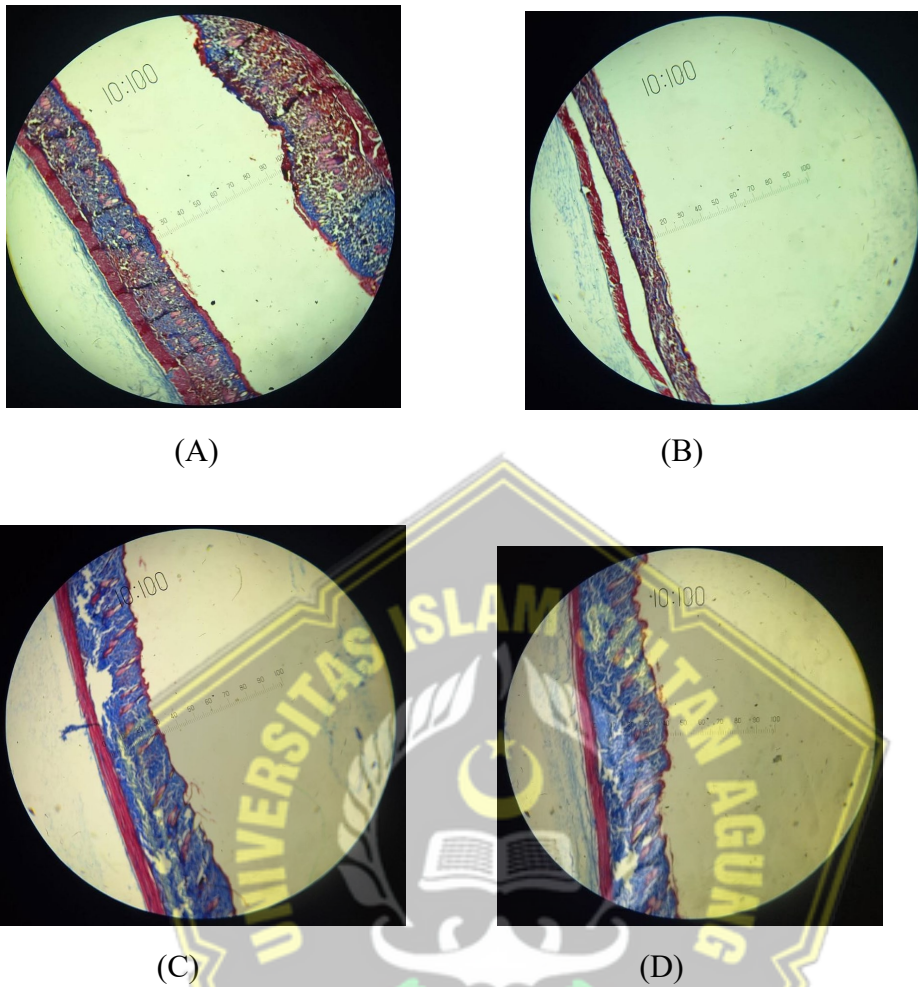


**Gambar 5.2.** Perbedaan Rerata Ketebalan Serabut Kolagen antar kelompok

Keterangan: \*\*\* signifikan

**Tabel 5.3.** Perebedaan rerata ketebalan serabut kolagen antar 2 kelompok dengan uji *Post Hoc LSD*

	K1	K2	K3	K4
K1		0.017	0.038	0.425
K2			0.000	0.003
K3				0.176
K4				



**Gambar 5.3.** Histopatologi ketebalan Serabut Kolagen Antar Kelompok.

Gambar 5.3. menunjukkan hasil pewarnaan *Masson's Trichrome* pada jaringan kulit dari empat kelompok. (A) Kelompok K1 merupakan kontrol sehat tanpa paparan sinar UVB. (B) Kelompok K2 yaitu kelompok yang hanya dipapar sinar UVB, tampak serabut kolagen yang paling tipis diantara kelompok lainnya. Sebaliknya, pada gambar (C) kelompok K3 dan gambar (D) kelompok K4 yang dipapar sinar UVB dan diberi air kelapa muda secara oral, tampak serabut kolagen yang lebih tebal dibandingkan kelompok K1 dan K2.

## 5.2. Pembahasan

Penelitian ini membuktikan bahwa pada kelompok yang dipapar sinar UVB memiliki kadar MMP-1 lebih tinggi dan ketebalan serabut kolagen lebih rendah dibandingkan kelompok sehat. Sinar UVB menginduksi stres oksidatif melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti *superoxide* ( $O_2^-$ ), *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), dan *hydroxyl radical* ( $\bullet OH$ ). Dalam kondisi fisiologis, enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *catalase* (CAT) berperan penting dalam menjaga homeostasis redoks dengan menetralkan ROS. Namun paparan UVB secara berulang menurunkan aktivitas ketiga enzim tersebut akibat peningkatan konsumsi selama proses detoksifikasi radikal bebas. Penurunan aktivitas SOD menyebabkan akumulasi *superoxide*, sedangkan penurunan GPx dan CAT menyebabkan peningkatan kadar *hydrogen peroxide* yang tidak terurai. Kondisi ini memperparah stres oksidatif yang kemudian mengaktifasi jalur pensinyalan intraseluler seperti *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) *Pathway* dan *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B). MAPK akan mengaktifasi *Activator Protein-1* (AP-1). Aktivasi AP-1 meningkatkan kadar *matrix metalloproteinases* (MMPs), terutama MMP-1. NF- $\kappa$ B juga dapat meningkatkan transkripsi MMP-1.<sup>724</sup> ROS bertindak sebagai sinyal *second messenger* yang memperkuat respon inflamasi terhadap sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  sehingga semakin meningkatkan produksi enzim MMP-1, yaitu enzim proteolitik yang berperan dalam degradasi kolagen yang merupakan komponen utama matriks dermis,

menghasilkan fragmentasi kolagen yang selanjutnya bertindak sebagai *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Fragmen kolagen tersebut mengaktifasi kembali jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK, yang memicu pelepasan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) dan memperkuat siklus patologis antara inflamasi kronis dan kerusakan kolagen yang berulang.<sup>2 11</sup>

*Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) merupakan sitokin utama yang berperan dalam regulasi sintesis kolagen melalui aktivasi jalur TGF- $\beta$ /Smad. Pada kondisi fisiologis, TGF- $\beta$  berikatan dengan reseptornya (T $\beta$ RII dan T $\beta$ RI), kemudian memfosforilasi Smad2/3 yang berikatan dengan Smad4 untuk masuk ke inti sel dan menginduksi transkripsi gen kolagen COL1A1, COL1A2, COL3A1. Namun, paparan sinar UVB terbukti dapat menekan jalur ini melalui induksi stres oksidatif dan aktivasi jalur MAPK yang selanjutnya meningkatkan kadar faktor transkripsi AP-1. Aktivasi AP-1 menghambat kadar T $\beta$ RII pada fibroblas dermal sehingga mengurangi aktivasi Smad2/3. Akibatnya, sintesis kolagen baru menurun secara signifikan. Selain itu, Sinar UVB menginduksi Smad7 (*inhibitory Smad*) melalui aktivasi AP-1. Smad7 bekerja menghambat fosforilasi Smad2/3 dan memfasilitasi degradasi reseptor TGF- $\beta$  sehingga respons prokolagen semakin tertekan.<sup>13</sup>

Adapun MMP-1 merupakan enzim kolagenase yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler. Peningkatan kadar MMP-1 dalam darah mencerminkan meningkatnya aktivitas degradasi kolagen di sistemik yang selanjutnya dapat memengaruhi degradasi kolagen pada jaringan kulit, sehingga berpengaruh terhadap berkurangnya ketebalan serabut kolagen yang

tampak di histopatologi kulit. Sebaliknya, kadar MMP-1 dalam darah yang lebih rendah berhubungan dengan terjaganya struktur dan ketebalan serabut kolagen yang tampak pada histopatologi kulit. Pada penelitian ini, kadar MMP-1 diperiksa melalui sampel darah sebagai gambaran sistemik, sedangkan ketebalan serabut kolagen dinilai melalui pemeriksaan histopatologi kulit, sehingga keduanya merepresentasikan proses degradasi dan remodeling kolagen yang saling berkaitan.<sup>2 11</sup>

Penelitian ini membuktikan bahwa pada kelompok perlakuan (K3 dan K4) memiliki kadar MMP-1 lebih rendah dan ketebalan serabut kolagen lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang hanya dipapar UVB saja. Pada kelompok K3 dengan pemberian air kelapa muda dosis 4mL/200grBB/hari memiliki penurunan MMP-1 dan peningkatan ketebalan serabut kolagen paling banyak dibandingkan kelompok lain. Air kelapa muda merupakan cairan endosperma dari buah *Cocos nucifera L* yang kaya akan senyawa bioaktif. Varietas kelapa hijau wulung lebih banyak dibudidayakan dan umum dijual sebagai air kelapa muda konsumsi maupun untuk terapi tradisional. Varietas ini sering digunakan dalam penelitian lokal karena kandungan antioksidan dan senyawa bioaktifnya lebih kuat.<sup>4</sup> Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya air kelapa muda mengandung beragam senyawa bioaktif penting seperti vitamin C, *L-arginine*, *L-methionine*, sitokinin, selenium, serta mineral mikro seperti Zn, Mn, dan Cu. Kandungan tersebut berperan dalam mekanisme antioksidan dan antiinflamasi melalui peningkatan aktivitas enzim endogen seperti SOD, CAT, dan GPx, serta penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) sebagai penanda peroksidasi lipid.<sup>31 32</sup> Penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa

pemberian *L-arginine* selama 15 hari pada tikus betina dapat meningkatkan elastisitas kulit, peningkatan jumlah serabut kolagen dan elastin pada pemeriksaan histologi.<sup>6</sup> Air kelapa muda mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti vitamin C, *L-arginine*, *L-methionine*, sitokinin, selenium, flavonoid, serta mineral mikro seperti magnesium (Mg), seng (Zn), dan mangan (Mn). Kombinasi senyawa ini berperan secara sinergis sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan stimulator sintesis kolagen dermis. Vitamin C pada air kelapa muda merupakan antioksidan kuat yang mendonorkan elektron untuk menetralkan ROS, sekaligus berfungsi sebagai kofaktor enzim *prolyl dan lysyl hydroxylase* yang berperan dalam tahap hidroksilasi prolin dan lisin pada pembentukan kolagen. Dengan menekan ROS, vitamin C dapat menghambat aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK-AP-1. Sehingga menurunkan kadar MMP-1 dan memperkuat struktur kolagen dermis. *L-arginine* dalam air kelapa muda merupakan prekursor *nitric oxide* (NO), yang membantu meningkatkan aktivitas enzim SOD dan GPx dalam menetralkan ROS. sehingga dapat menekan aktivasi MAPK-AP 1 dan NF- $\kappa$ B. *L-arginine* juga dapat mensintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ . Demikian pula, *L-methionine* berperan dalam pembentukan *glutathione* (GSH), senyawa antioksidan endogen yang dapat menetralkan ROS sehingga mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK. Selain itu, *methionine* juga berfungsi dalam pembentukan *S-adenosylmethionine* (SAM) yang mengatur kadar gen kolagen melalui metilasi DNA.<sup>4 22</sup>

Sitokinin dalam air kelapa muda merupakan hormon alami tumbuhan yang memiliki aktivitas anti-aging dengan cara menghambat pembentukan

ROS, mencegah apoptosis fibroblas, dan mensintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ . Selenium sebagai komponen enzim *glutathione peroxidase* (GPx) juga penting dalam mengurangi akumulasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan lipid peroksida, sehingga mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK. Sementara itu, mineral seperti Mg, Zn, dan Mn berperan sebagai kofaktor enzim antioksidan (Cu/Zn-SOD dan Mn-SOD) yang melindungi sel dari stres oksidatif dan meningkatkan transkripsi gen kolagen.<sup>4 22</sup> Selain komponen utama tersebut, air kelapa muda juga mengandung asam amino seperti *L-aspartic acid*, *L-glutamic acid*, *L-histidine*, dan *L-serine* yang berperan sebagai antioksidan ringan, penyeimbang pH intrasel, dan pendukung metabolisme energi fibroblas. Senyawa-senyawa ini turut menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK serta meningkatkan sintesis kolagen. Flavonoid dalam air kelapa muda juga berkontribusi dalam perlindungan kulit melalui mekanisme penghambatan oksidasi lipid, penurunan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK-AP-1, serta stimulasi jalur TGF- $\beta$ /Smad yang berperan dalam kadar gen kolagen.<sup>4 22</sup>

Secara keseluruhan, paparan UVB meningkatkan produksi ROS dan sitokin proinflamasi yang mengaktifasi jalur MAPK dan NF- $\kappa$ B, menyebabkan peningkatan kadar MMP-1 dan degradasi kolagen dermis yang berujung pada *photoaging*. Kandungan bioaktif dalam air kelapa muda bekerja secara sinergis untuk menetralkan ROS, menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dan MAPK, serta berperan dalam sintesis kolagen melalui stimulasi TGF- $\beta$ /Smad dan aktivitas enzim hidrosilase yang penting dalam pembentukan struktur

kolagen. Dengan demikian, air kelapa muda berpotensi sebagai anti *photoaging* alami terhadap kerusakan kulit akibat UVB. <sup>4 22</sup>

Pemilihan dosis air kelapa muda 4 mL/200grBB/hari pada penelitian ini didasarkan pada pertimbangan ilmiah dan aplikatif. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa dosis 8mL/200grBB/hari berat badan tikus merupakan dosis optimal dalam memberikan efek antioxidant dan anti inflamasi. Namun, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi apakah dosis yang lebih rendah, yaitu 4mL/200grBB/hari, sudah mampu memberikan efek yang sebanding. Pendekatan ini dilakukan sebagai upaya untuk mengidentifikasi dosis efektif minimal yang tetap memberikan manfaat biologis. Selain itu, mempertimbangkan apabila diaplikasikan pada manusia, dosis yang lebih tinggi berpotensi kurang praktis untuk penggunaan jangka panjang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian air kelapa muda dosis 8ml/200grBB/hari secara oral dapat memberikan efek fotoprotektif yang tampak pada penurunan kadar MMP-1 dan peningkatan ketebalan serabut kolagen dibandingkan kelompok yang hanya dipapar sinar UVB. Namun, dosis 4ml/200grBB/hari juga terbukti dapat menurunkan kadar MMP-1 dan meningkatkan ketebalan serabut kolagen bahkan menunjukkan hasil yang lebih optimal dibandingkan dosis 8ml/200gBB. Temuan ini mengindikasikan bahwa efek fotoprotektif air kelapa muda dapat dicapai secara efektif pada dosis 4ml/200gBB/hari dalam kondisi penelitian ini.

Keterbatasan penelitian ini adalah adanya perbedaan frekuensi dalam pemberian perlakuan antar kelompok. Pada penelitian ini kelompok K3

diberikan air kelapa muda secara oral menggunakan sonde dosis 4 mL/200grBB/hari menggunakan sonde satu kali sehari, sedangkan kelompok K4 diberikan air kelapa muda secara oral menggunakan sonde dosis total 8 mL/200grBB/hari yang dibagi menjadi dua kali pemberian. Perbedaan frekuensi penyondean tersebut berpotensi menimbulkan stres pada hewan coba, yang dapat memengaruhi respons fisiologis dan hasil penelitian. Oleh karena itu, pada penelitian selanjutnya disarankan agar frekuensi pemberian perlakuan diseragamkan antar kelompok. Dosis yang lebih rendah dapat diberikan dengan volume yang disesuaikan atau diencerkan sehingga total volume dan frekuensi penyondean sama, guna meminimalkan efek stres akibat prosedur dan memperoleh hasil yang lebih optimal. Pada penelitian ini penilaian ketebalan serabut kolagen dilakukan secara manual tanpa menggunakan software analisis citra seperti *ImageJ*, sehingga sensitivitas dan objektivitas pengukuran lebih rendah. Selain itu, penilaian inflamasi dan degradasi matriks ekstraseluler hanya didasarkan pada MMP-1, sehingga penelitian selanjutnya disarankan untuk mengevaluasi marker lain yang berperan dalam remodeling kolagen, seperti MMP-3, MMP-9, TIMP-1, serta mediator inflamasi terkait.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

- 6.1.1. Pemberian air kelapa muda secara oral berpengaruh terhadap kadar MMP-1 dan ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur wistar yang terpapar sinar UVB
- 6.1.2. Pemberian air kelapa muda secara oral dosis 4mL/200gBB/hari dan 8mL/200gBB/hari berpengaruh terhadap kadar MMP-1 pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB
- 6.1.3. Pemberian air kelapa muda secara oral dosis 4mL/200gBB/hari dan 8mL/200gBB/hari berpengaruh terhadap ketebalan serabut kolagen pada kulit tikus jantan galur Wistar yang terpapar sinar UVB
- 6.1.4. Terdapat perbedaan yang signifikan kadar MMP-1 antar kelompok kontrol dan perlakuan.
- 6.1.5. Terdapat perbedaan yang signifikan ketebalan serabut kolagen pada kulit antar kelompok kontrol dan perlakuan.

#### 6.2. Saran

- 6.2.1. Penelitian lebih lanjut disarankan agar frekuensi pemberian perlakuan diseragamkan antar kelompok. Dosis yang lebih rendah dapat diberikan dengan volume yang disesuaikan atau diencerkan sehingga total volume dan frekuensi penyondean sama antar kelompok.

- 6.2.2. Penilaian ketebalan serabut kolagen dilakukan menggunakan software analisis citra seperti *ImageJ*, sehingga sensitivitas dan objektivitas pengukuran lebih tinggi
- 6.2.3. Mengevaluasi marker lain yang berperan dalam remodelling kolagen, seperti MMP-3, MMP-9, TIMP-1, dan mediator inflamasi terkait



## DAFTAR PUSTAKA

1. R World Health Organization. Radiation: ultraviolet (UV) radiation [Internet]. Geneva: WHO; 2016 [cited 2025 Sep 21]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/radiation-ultraviolet-\(uv\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/radiation-ultraviolet-(uv))
2. Kim DJ, Iwasaki A, Chien AL, Kang S. UVB-mediated DNA damage induces matrix metalloproteinases to promote photoaging in an AhR- and SP1-dependent manner. *JCI Insight*. 2022;7(9):1-14. doi:10.1172/jci.insight.156344
3. Milosheska D, Roškar R. Use of Retinoids in Topical Antiaging Treatments: A Focused Review of Clinical Evidence for Conventional and Nanoformulations. *Adv Ther*. 2022;39(12):5351-5375. doi:10.1007/s12325-022-02319-7
4. Zulaikhah ST. Health Benefits of Tender Coconut Water (TCW). *Int J Pharm Sci Res*. 2019;10(2):474-480. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).474-80
5. Zulaikhah ST, Suwondo A. Effects of Tender Coconut Water on Antioxidant Enzymatic Superoxida Dismutase (SOD), CATALASE (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) and Lipid Peroxidation In Mercury Exposure Workers. *Int J Sci Res*. 2015;4(12):517-524. doi:10.21275/v4i12.nov151788
6. de Souza Á do PB, de Oliveira MMR, de Andrade RR, de Amorim RFB, Bocca AL, Borin M de F. The in vivo effect of L-arginine on skin elasticity in mice. *Brazilian J Pharm Sci*. 2017;53(3). doi:10.1590/s2175-97902017000300045
7. Gromkowska-Kępcza KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(11):3427-3431. doi:10.1111/jocd.14033
8. Merin KA, Shaji M KR. A review on sun exposure and skin diseases. *J Fam Med Prim Care*. 2023;12:215-222. doi:10.4103/jfmprc.jfmprc\_1550\_22
9. Van Praag MCG, Mulder AA, Class FHJ, Vermeer BJ, Mommaas AM. Long-term ultraviolet B-induced impairment of Langerhans cell function: An immunoelectron microscopic study. *Clin Exp Immunol*. 1994;95(1):73-77. doi:10.1111/j.1365-2249.1994.tb06017.x
10. Serra R. Matrix Metalloproteinases in Health and Disease 3.0. *Biomolecules*. 2024;14(9):1-2. doi:10.3390/biom14091059
11. Feng C, Chen X, Yin X, Jiang Y, Zhao C. Matrix Metalloproteinases on Skin

- Photoaging. *J Cosmet Dermatol.* 2024;23(12):3847-3862. doi:10.1111/jocd.16558
12. Anshori AM, Wiraguna AAGP, Pangkahila W. Pemberian oral ekstrak kulit buah lemon (*Citrus limon*) menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 (matrix metaloproteinase-1) dan penurunan jumlah kolagen pada tikus putih galur wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipajan sinar UV-B. *J e-Biomedik.* 2017;5(1):3-7. doi:10.35790/ebm.5.1.2017.15036
  13. Jiang H, Zhou X, Chen L. Asiaticoside delays senescence and attenuate generation of ROS in UV-exposure cells through regulates TGF- $\beta$ 1/Smad pathway. *Exp Ther Med.* 2022;24(5):1-13. doi:10.3892/etm.2022.11603
  14. Murlistyarini S, Dani AA. Peran Matriks Metaloproteinase (Mmp) Pada Proses Photoaging. *J Dermatology, Venereol Aesthetic.* Published online 2022:13-21. <http://jdva.ub.ac.id>
  15. Karsdal MA. *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers.* Cambridge: Academic Press; 2017.
  16. Bar O, Valiukevičienė S. Skin Aging and Type I Collagen: A Systematic Review of Interventions with Potential Collagen-Related Effects. *Cosmetics.* 2025;12(4):129. doi:10.3390/cosmetics12040129
  17. Onursal C, Dick E, Angelidis I, Schiller HB, Staab-Weijnitz CA. Collagen Biosynthesis, Processing, and Maturation in Lung Ageing. *Front Med.* 2021;8(May):1-23. doi:10.3389/fmed.2021.593874
  18. Prades A, Dornier M, Diop N, Pain JP. Coconut water uses, composition and properties: A review. *Fruits.* 2012;67(2):87-107. doi:10.1051/fruits/2012002
  19. Naik, M., Rawson, A., & Venkatachalapathy N. Tender coconut water: A review on recent advances in processing and preservation. *Food Sci Technol J.* 2020;35(5):1215–1236. doi:10.1590/fst.19919
  20. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients.* 2017;9(8). doi:10.3390/nu9080866
  21. Shi S, Wang W, Wang F, et al. Research Progress in Coconut Water: A Review of Nutritional Composition, Biological Activities, and Novel Processing Technologies. *Foods.* 2025;14(9):1-30. doi:10.3390/foods14091503
  22. Halim, H. H., Pak Dek, M. S., Abdul Hamid, A., Saari, N., Mohd Lazim, M. I., Abas, F., Ngalim, A., Ismail, A., & Jaafar AH. Novel sources of bioactive compounds in coconut (*Cocos nucifera* L.) water from different maturity levels and varieties as potent skin anti-aging strategies and anti-fatigue agents. *Food Biosci.* 2023;51. doi:10.1016/j.fbio.2023.102326

23. Păcularu-Burada B, Cîrîc AI, Begea M. Anti-Aging Effects of Flavonoids from Plant Extracts. *Foods*. 2024;13(15):1-30. doi:10.3390/foods13152441
24. Ganguly, B., Hota, M., & Pradhan J. Skin aging: Implications of UV radiation, reactive oxygen species and natural antioxidants. *In IntechOpen*. Published online 2021. doi:10.5772/intechopen.100102
25. Kostov K, Blazhev A. Changes in Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Patients with Essential Hypertension. *Bioengineering (Basel)*. 2022;9(3):119. doi:10.3390/bioengineering9030119
26. Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques 8th ed. *elsevier*. Published online 2019.
27. Maharani, V., Utariani, A., & Susilo I. Effect of Ropivacaine Infiltration in Incisional Wound on Fibroblast Growth Factor (FGF) Expression and Collagen Thickness in Wound Healing. *SYLWAN*. 2020;164(9):306-318.
28. Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, et al. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):392-400. doi:10.3892/ijmm.2012.1011
29. Lee HY, Kim EJ, Cho DY, et al. Photoprotective Effect of Fermented and Aged Mountain-Cultivated Ginseng Sprout (*Panax ginseng*) on Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging in a Hairless Mouse Model. *Nutrients*. 2023;15(7). doi:10.3390/nu15071715
30. Dahlan MS. Pintu gerbang memahami statistik, metodologi dan epidemiologi. Jakarta: Sagung Seto; 2014
31. Zulaikhah ST, et al. Tender Coconut Water (*Cocos nucifera* L.) Can Increase Antioxidant Enzymes and Decrease MDA Levels: Experimental Study on Cigarette Smoke-Exposed Rats. *Pharmacogn J*. 2022;14(5):469-476.
32. Zulaikhah ST, Suwondo A. Effects of Tender Coconut Water on Antioxidant Enzymatic Superoxida Dismutase ( SOD ), CATALASE ( CAT ), Glutathione Peroxidase ( GPx ) and Lipid Peroxidation In Mercury Exposure Workers. 2019;(December 2015).
33. Karsdal MA, Krarup H, Sumer EU, Wulf H, Henrotin Y, Ladel C et al. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. 1st ed.; 2017.
34. Nishtha ., Sonia . Coconut Water: A Review on Its Health Benefits, Pharmacological Properties and Traditional Uses. *J Pharm Res Int*. 2021;33:24-30. doi:10.9734/jpri/2021/v33i64b3532