

**UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
SECARA IN VITRO DAN IN SILICO**

TESIS

Oleh

ZULIATI NINGSIH

NIM : 19821002



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PASCASARJANA UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**UJI POTENSI ANTIAGING EKSTR UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK
DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)**

TESIS

**Oleh :
ZULIATI NINGSI
NIM: 19821002**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Menempuh Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Magister Sains (M.Si.)**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
SECARA IN VITRO DAN IN SILICO**

TESIS

**Oleh :
ZULIATI NINGSIH
NIM: 19821002**

**telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal : 22 Desember 2022**

Pembimbing I



**Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 2000 03 2 001**

Pembimbing II



**Prof. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19741018 200312 2 002**

Mengetahui,

Ketua Program Magister Biologi



**Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si
NIP. 19710919 200003 2 001**

**UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
SECARA IN VITRO DAN IN SILICO**

TESIS

**Oleh :
ZULIATI NINGSIH
NIM: 19821002**

**Telah Dipertahankan
di Depan Dewan Penguji Tesis dan Dinyatakan Diterima sebagai
Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Magister Sains (M.Si)
Tanggal : 22 Desember 2022**

Penguji Utama : Dr. Evika Sandi Savitri, M.P ()
NIP. 19741018 200312 2 002

Ketua Penguji : Dr. Hj. Akyunul Jannah, M.Si ()
NIP. 19750410 200501 2 009

Sekretaris Penguji : Prof.Dr.drh.Hj.Bayyinatul Muchtaromah, M.Si ()
NIP. 19710919 2000 03 2 001

Anggota Penguji : Prof.Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si ()
NIP. 19671113 199402 2 001

**Mengesahkan,
Mengetahui,**

Ketua Program Magister Biologi



Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si.
NIP. 19710919 200003 2 001

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tesis ini dipersembahkan untuk orang-orang yang telah mendukung penulis untuk menyusun tesis ini, khususnya :

1. Ayah dan Ibunda tercinta, Bapak H. Mahmudi dan Sri Bawon yang telah merawat, mendidik, dan mendoakan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik.
2. Suami tersayang, M.Ulil Absor, SE. beserta putra-putra yang sholih Asrofy Dzaky Haidar dan Ardani Dzaky Haidar yang memberikan support dan doa-doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik.
3. Ibu Prof. Dr. Drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, serta ilmu untuk memberikan bimbingan kepada penulis dengan penuh kesabaran sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan baik.
4. Ibu Prof. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan arahan dan kesabaran sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan baik.
5. Bapak Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd selaku dosen wali dengan kesabarannya telah banyak memberikan motivasi kepada kami sehingga penulisan naskah tesis bisa terselesaikan.
6. Semua dosen maupun asisten dosen di Program Studi Magister Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat.

7. Ibu Lil Hanifah, M.Si selaku pendamping penelitian In Vitro yang telah memberikan arahan dengan sabar sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan baik.
8. Bapak Didik Wahyudi, M.Si selaku pendamping penelitian In Silico yang telah memberikan arahan dengan sabar sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan baik.
9. Teman-teman seperjuangan dari awal hingga akhir studi Magister Biologi Angkatan 2019 yang selalu memberikan motivasi untuk menyelesaikan tesis ini.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Zuliati Ningsih
NIM : 19821002
Program Studi : Magister Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK DAUN PEGAGAN
(Centella asiatica) SECARA IN VITRO DAN IN SILICO

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hokum atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Desember 2022
Yang membuat pernyataan,



Zuliati Ningsih
NIM. 19821002

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya

UJI POTENSI ANTIAGING EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

Zuliati Ningsih, Bayyinatul Muchtaromah, Retno Susilowati

Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Penuaan (aging) merupakan proses fisiologi yang tidak dapat dihindari, tetapi dapat dicegah dengan cara pemberian antioksidan. Antioksidan bisa diperoleh dari ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*). Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) memiliki senyawa metabolit sekunder yang memiliki efek biologis mencegah penuaan. Untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak tersebut dilakukan uji *In vitro* dan *In silico*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap konfluenitas, viabilitas kultur sel fibroblast dan senyawa aktif dari ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang berpotensi sebagai antiaging. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan (kontrol, P1:10%, P2:15%, P3:20%, P4:25%) masing-masing 4 ulangan. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diperoleh dengan metode ekstraksi dan meserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Pengujian terhadap konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast dan ikatan senyawa (ligan) dengan enzim collagenase dan elastase (reseptor). Analisis data menggunakan One Way Anova dengan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian tertinggi pada perlakuan P4 = 25% dengan konfluenitas 265 sel dan viabilitas 75,36%. *In silico* ikatan senyawa yang paling kuat adalah senyawa luteolin (-9,6, -9,9) dan kaemferol (-9,4, -9,1). Pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mempengaruhi konfluenitas, viabilitas sel fibroblast dan ikatan senyawa dengan enzim collagenase dan elastase yang paling kuat senyawa luteolin dan kaemferol.

Kata kunci : ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*), konfluenitas, viabilitas, screening

ANTIAGING POTENTIAL TEST OF GOTU KOLA (*Centella asiatica*) IN VITRO AND IN SILICO

Zuliati Ningsih, Bayyinatul Muchtaromah, Retno Susilowati

Biology Masters Study Program , Faculty Science and technology,
State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Aging is a physiological process that is not could avoided , however could prevented with method gift antioxidants . Antioxidant can obtained from extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*). Extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*) has compound metabolites secondary who has effect biological prevent aging . For knowing influence from extract the done test *in vitro* and *In silico*. Aim from study this is for knowing influence extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*) against confluency , viability culture fibroblasts and _ compound active from extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*) potential as an antiaging. Study this use design random complete with 5 treatments (control , P1:10 % , P2:15% , P3:20% , P4:25%) each with 4 replications . Extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*) was obtained with method extraction and meseration with use solvent 70% ethanol . Testing to confluence and viability fibroblasts and _ bond compounds (ligands) with collagenase and elastase enzymes (receptors) . Data analysis using One Way Anova with test continued Duncan. Results study highest on treatment P4 = 25% with confluence of 265 cells and viability 75 ,36 % . *In silico* bond strongest compound luteolin(-9,6, -9,9) and kaemferol (-9.4, -9.1). Giving extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*) influences confluency, viability fibroblasts and bond compound with the most potent collagenase and elastase enzymes compound luteolin and kaempferol .

Keywords : extract leaf gotu kola (*Centella asiatica*), confluence, viability, screening

اختبار محتمل مضاد للشيخوخة من كينتيلا (سياتيكا) في فيترو وفي سيليكو

الزلياتي Ningsih ، Bayyinatul Muchtaromah ، ريننو سوسيلواتي

برنامج دراسة ماجستير الأحياء ، الكلية علم و التكنولوجيا _
جامعة الدولة الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج

نبذة مختصرة

الشيخوخة هي عملية فسيولوجية ليست كذلك _ استطاع تجنبها ، مع ذلك استطاع منعت مع طريقة هدية مجانية مضادات الأكسدة . مضادات الأكسدة علبة تم الحصول عليها من استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) . استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) لديها مُجمَع المستقبلات من لديه الثانوية تأثير بيولوجي يحول دون الشيخوخة . إلى عن على معرفة تأثير من استخراج ال انتهى امتحان في المختبر وفي السيليكو . هدف من دراسة هذه يكون إلى عن على معرفة تأثير استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) ضد التقاء ، قابلية البقاء الثقافة الخلايا الليفية و _ مُجمَع نشيط من استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) المحتملة باعتباره انتياغينغ . يذاكر هذه استعمال التصميم عشوائي اكتمال مع 5 علاجات (تحكم ، P4: 25% ، P3: 20% ، P2: 15% ، P1: 10%) لكل منها 4 مكررات . استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) مع طريقة استخلاص و تسهل مع استعمال مذيب 70% إيثانول . اختبارات إلى التقاء نهرين و بقاء الخلايا الليفية و _ رابطة المركبات (الترابطات) مع إنزيمات الكولاجيناز والإيلاستاز (مستقبلات) . تحليل البيانات باستخدام طريقة واحدة Anova مع امتحان تابع دنكان . نتائج دراسة الأعلى تشغيل العلاج P4 = 25% مع التقاء 265 خلية و قابلية البقاء 75 ، 36% . في السيليكو رابطة أقوى مركب _ يكون مُجمَع لوتولين (9- ، 6 ، 9- ، 9) و كايمبرول (9.4- ، 9.1-) . إعطاء استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) التأثيرات التقاء ، قابلية البقاء الخلايا الليفية و _ رابطة مُجمَع مع أقوى إنزيمات الكولاجيناز والإيلاستاز _ _ مُجمَع لوتولين و كايمبرول .

الكلمات الرئيسية : _ استخراج ورقة الشجر غوتو كولا (كينتيلا /سياتيكا) ، التقاء ، الجدوى ، الفحص

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrohmaanirrohim, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul “Bioprospeksi Uwi Liar *Dioscorea sp.* Sebagai Penghasil Uwi”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. yang telah menegakkan diinul Islam yang terpatri hingga akhirul zaman.

Aamiin.

Berkat bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada :

1. Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Hariani, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Ketua Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Prof.Dr.Hj. Retno Susilowati, M.Si. selaku pembimbing I dan pembimbing II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keihklasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.

5. Dr.H.Eko Budi Minarno, M.Pd selaku Dosen wali yang telah membimbing dan memberi motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik
6. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang memberikan ilmu yang mermanfaat.
7. Ibu Lil Hanifah yang sudah membantu penelitian di Laboratorium kultur jaringan hewan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
8. Bapak Didik Wahyudi, M.Si yang sudah membantu penelitian *In Silico* di Laboratorium jaringan tumbuhan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
9. Bapak, Ibu, suami, anak-anak dan keluarga tercinta yang telah memberikan Doa dukungan serta motivasi kepada penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 22 Desember 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
مجلد	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	5
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Manfaat penelitian	6
1.5 Batasan masalah	6
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
2.1 In Vitro	7
2.1.1 Definisi penuaan	7
2.1.2 Penyebab Penuaan	7
2.1.3 Radikal Bebas	8
2.1.4 Jenis radikal Bebas	9
2.1.5 Efek radikal bebas	11
2.1.6 Sumber radikal bebas	12
2.1.7 Stess Oksidatif	13
2.1.8 Fibroblast	14
2.1.9 Proses Penuaan Fibroblast	15
2.1.10 Kolagen dan degradasi oleh kolagenase	16
2.1.11 Elastin dan degradasinya oleh elastase	18

2.1.12 Teori penuaan	19
2.1.13 Antioksidan	21
2.1.14 Antioksidan enzimatik	23
2.1.15 Antioksidan alami	24
2.1.16 Peran aktioksidan non enzimatik	24
2.1.17 Penjelasan al-qur'an	25
2.1.18 Pegagan	25
2.1.19 Kandungan pegagan	27
2.1.20 Manfaat pegagan	28
2.1.21 Kultur sel	29
2.1.22 Pertumbuhan sel	31
2.2 In Silico	33
2.2.1 Bioinformatika	33
2.2.2 Pubchem Compound	34
2.2.3 Swiss Adme	35
2.3 Kerangka Konseptual	35
2.3.1 Uraian kerangka konseptual	36

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan rancangan penelitian	38
3.2 Waktu dan tempat penelitian	38
3.3 Variabel penelitian	39
3.4 Alat dan bahan	39
3.5 Prosedur penelitian	40
3.6 Analisis data	45
3.7 Alur penelitian	47

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji potensi antiaging ekstrak daun pegagan	48
4.2 Screening senyawa yang berpotensi antiaging	54

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan	63
5.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Al-qur'an surat Ali Imron ayat 190-191 yang bunyinya :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ
وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka. (QS Al Imron : 190-191).

Surat Ali Imron ayat 190-191 menjelaskan bahwa penciptaan langit dan bumi beserta pergantian malam dan siang merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT. Tanda-tanda kekuasaan Allah SWT di alam semesta hanya disadari oleh *Ulul albab*. Ciri ulul albab adalah berzikir dan berpikir, setiap ulul albab selalu mengingat Allah dalam kondisi apapun dan menggunakan akalnyanya untuk bertafakur dan memikirkan penciptaan alam semesta tidak ada yang sia-sia karena semua benar dan bermanfaat.

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tanaman ciptaan Allah yang sangat besar manfaatnya bagi manusia. Kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiaging, antioksidan dan anti inflamasi mampu melindungi kerusakan organ tubuh paling luar yaitu kulit, karena kulit terpapar langsung dengan lingkungan luar dan hasil reaksi metabolisme. Hasil reaksi metabolisme berkontribusi terhadap proses penuaan (*aging*).

Penuaan (*aging*) merupakan proses fisiologi yang tidak dapat dihindari, tetapi dapat dicegah dengan cara pemberian antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dibutuhkan tubuh untuk menentralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan terhadap sel normal, protein dan lemak. Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Murry *et al*, 2003).

Radikal bebas dalam tubuh terjadi karena ketidak seimbangan antara paparan ROS dengan antioksidan. Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan antioksidan dalam tubuh menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang dapat menimbulkan penuaan (*aging*). Radikal bebas dalam tubuh terjadi karena adanya proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga atau aktifitas tubuh yang berlebihan, peradangan dan paparan polusi dari luar seperti asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat dan radiasi matahari (Parwata, 2016). Untuk menyeimbangkan antara oksidan dengan paparan ROS yang terjadi secara terus menerus bisa dicegah dengan pemberian antioksidan alami yang ada pada tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mengandung antioksidan tinggi yang bermanfaat bagi tubuh manusia untuk menjaga sel-sel tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan menghambat proses diferensiasi (Hebbar, 2019). Muchtaromah (2016) mengatakan bahwa senyawa aktif yang berpotensi sebagai anti oksidan dalam ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) adalah golongan senyawa triterpenoid, vitamin, flavonoid dan saponin. Penelitian yang dilakukan oleh Prestiyanti (2021) menunjukkan bahwa pemberian pasta pegagan 10% dioles pada bagian punggung tikus yang luka dapat meningkatkan jumlah sel fibroblast

dengan rerata sebesar $97,98 \pm 25,67$ sel dengan metode *in vivo*. Berbeda dengan penelitian sebelumnya, Penelitian ini menggunakan metode *in vitro* dengan media kultur sel fibroblast fetus tikus dengan 5 perlakuan yaitu kontrol, P1 = 10%, P2 = 15%, P3 = 20%, P4 = 25% masing-masing 4 ulangan dengan parameter konfluensitas, viabilitas sel fibroblast dan ikatan senyawa (ligan) dengan enzim collagenase dan elastase (reseptor).

Penelitian ini menggunakan sel fibroblast fetus tikus karena mudah untuk dikultur, memiliki kemampuan tumbuh dan melekat serta regenerasinya tinggi (Freshney, 2005). Selain itu sel fibroblast merupakan jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan matriks ekstraseluler secara berkesinambungan (Freshney, 2005). Pengembangan sel fibroblast fetus tikus yang berumur 18 hari kebuntingan memiliki beberapa kendala diantaranya produksi radikal bebas yang berlebih. Radikal bebas *in vitro* diduga berasal dari beberapa perlakuan yang dilakukan pada saat kultur, seperti paparan sinar UV, washing, sentrifus dan tripsinasi. Pada proses metabolisme normal sel menghasilkan partikel-partikel kecil yang disebut radikal bebas, partikel tersebut dapat merusak jaringan normal jika jumlahnya terlalu banyak. Sumber utama radikal bebas adalah adanya elektron yang tidak berpasangan pada rantai transport elektron, misalnya yang ada dalam mitokondria, retikulum endoplasma dan molekul oksigen yang menghasilkan superoksida. Antioksidan dapat melindungi membran sel dan menetralkan terbentuknya radikal bebas.

Konfluenitas adalah tumbuhnya sel kultur primer jaringan secara homogeny. Pengamatan konfluenitas sel dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan sel fibroblast sebelum dan sesudah kultur. Konfluenitas sel fibroblast diamati berdasarkan tingkat perlekatan sel pada substrat dan ekspansi sel menggunakan mikroskop inverted dan

dianalisis menggunakan program *ImageJ*. Viabilitas adalah perbandingan jumlah sel yang hidup (*viable*) dengan sel yang mati (*non viable*) yang dihitung pada saat kultur yang mencapai konfluen. Perhitungan viabilitas sel fibroblast dilakukan untuk mengetahui prosentase perbandingan antara sel hidup dan sel mati. Perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan trypan blue 0.4% untuk membedakan antara sel mati dan hidup (Rahmawati, 2013).

Uji *in silico* dilakukan untuk mengetahui ikatan senyawa (ligan) dengan enzim collagenase dan elastase (reseptor). Dalam uji *in silico* dilakukan screening senyawa dengan tujuan mengetahui nilai *binding affinity* (ukuran kemampuan ikatan antara ligan dengan reseptor). Screening senyawa dilakukan dengan instrumen diatas 2% dari presentase area senyawa, kemudian dilanjutkan screening menggunakan software PASSOnline. screening menggunakan software PASSOnline dilakukan untuk mengetahui aktifitas senyawa dan prediksi nilai senyawa aktif dan in aktif (P_a , P_i). Molecular docking dilakukan untuk mengetahui ikatan senyawa dengan enzim collagenase dan elastase dengan referensi inhibitor kojic acid dan quercetin (Setiawan, 2015).

Kojic acid memiliki nama lain 5-hidroksi-2- hidroksimetil-4H-pyran-4-one dan 5-hidroksi-2-hidroksimetil-4-piron. pemerian berupa mengkristal, tidak berwarna, prismatic jarum yang menyublim dalam ruang hampa tanpa perubahan apa pun dan memiliki kelarutan yang larut dalam air, etanol dan etil asetat. kurang larut dalam eter, campuran alkohol eter, kloroform dan piridin kojic acid biasa digunakan sebagai pemutih (Rosfarizan et al., 2010). Kojic acid berfungsi sebagai agen depigmenting yang tidak beracun dengan efek penghambatan yang memuaskan pada pembentukan melanin dan mengurangi aktivitas tyrosinase. Sehingga kojic acid dapat diharapkan bisa digunakan

sebagai pencerah untuk kulit, selain itu kojic acid juga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan (Haerani, 2017).

Quercetin memiliki sifat antioksidan yang berfungsi untuk mencegah kerusakan sel tubuh akibat radikal bebas. Kerusakan akibat radikal bebas ini bisa menyebabkan berbagai gangguan kesehatan seperti penuaan (Jauhar *et al*, 2022)

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Apakah Ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap konfluenitas kultur sel fibroblast?
2. Apakah Ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap viabilitas kultur sel fibroblast?
3. Senyawa aktif apakah yang terkandung dari ekstrak *Centella asiatica* yang berpotensi antiaging melalui uji in silico?

1.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan untuk :

1. Untuk mengetahui Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) berpengaruh terhadap konfluenitas kultur sel fibroblast
2. Untuk mengetahui Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) berpengaruh terhadap viabilitas kultur sel fibroblast
3. Untuk mengetahui senyawa aktif dari ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang berpotensi antiaging melalui uji in silico

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap konfluenitas kultur sel fibroblast
2. Mengetahui ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap viabilitas kultur sel fibroblast
3. Mengetahui senyawa aktif dari ekstrak *Centella asiatica* yang berpotensi antiaging melalui uji in silico

1.5 Batasan masalah

1. Sampel berupa serbuk simplisia dari daun pegagan (*Centella asiatica*) yang diperoleh dari perkebunan desa Kasri kecamatan Bululawang Kab.Malang.
2. Ekstraksi sampel simplisia dari serbuk pegagan (*Centella asiatica*) yang diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 70% .
3. Pengencer ekstrak pegagan menggunakan DMSO 10%.
4. Uji konfluenitas menggunakan software Imagej dan viabilitas menggunakan automatic countess cell.
5. Uji viabilitas menggunakan trypan blue 0.4%.
6. Kultur sel fibroblast fetus tikus yang berumur kebuntingan 18 hari, diambil seluruh tubuh dibuang kepala dan organ dalamnya.
7. Screening manual dilakukan untuk memilih senyawa yang nilai prosentase area tertinggi dengan kriteria nilai diatas 2%.
8. Screening menggunakan software PASSOnline dilakukan untuk mengetahui senyawa yang berpotensi sebagai antiaging dari hasil screening manual.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 In Vitro

2.1.1 Definisi penuaan (Aging)

Penuaan (Aging) adalah suatu proses menurunnya kemampuan suatu jaringan secara perlahan untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur serta fungsi secara normal atau fisiologis. Banyak faktor yang menyebabkan seseorang menjadi tua kemudian menyebabkan sakit, dan akhirnya membawa pada kematian. Pada dasarnya, banyak faktor dapat dikelompokkan menjadi dua faktor yaitu faktor endogen dan eksogen. Beberapa faktor endogen adalah radikal bebas, hormon yang berkurang, proses glikosilasi, metilasi, apoptosis, sistem kekebalan yang menurun dan gen. Faktor eksogen adalah gaya hidup tidak sehat, diet tidak sehat, polusi lingkungan, stres dan ekonomi (Pangkahila, 2011).

2.1.2 Penyebab penuaan

Setelah mencapai usia dewasa, secara alami seluruh komponen tubuh tidak dapat berkembang lagi. Terdapat 2 faktor yang mempengaruhi, yaitu: faktor internal dan faktor eksternal. Beberapa faktor internal adalah radikal bebas, hormon yang berkurang, proses glikosilasi, metilasi, apoptosis, sistem kekebalan yang menurun dan genetik. Faktor eksternal adalah pola hidup yang tidak sehat, kebiasaan yang salah, polusi lingkungan, stres, kemiskinan dan diet yang tidak sehat. Faktor-faktor ini dapat dicegah, diperlambat bahkan mungkin dihambat sehingga kualitas hidup dapat dipertahankan. Lebih jauh lagi usia harapan hidup dapat lebih panjang dengan kualitas hidup yang baik (Pangkahila, 2011).

2.1.3 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan salah satu produk kimia dalam tubuh berupa suatu atom atau molekul yang terdiri dari satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga senyawa ini bersifat sangat reaktif dan radikal. Radikal bebas juga bisa diartikan sebagai kelompok bahan atom kimia baik berupa atom molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya atau kehilangan elektron, sehingga apabila dua radikal bertemu maka akan membentuk ikatan kovalen. Molekul biologi pada dasarnya tidak ada yang bersifat radikal, namun apabila molekul non radikal bertemu dengan atom bebas maka akan terbentuk suatu molekul radikal yang baru (Parwata, 2016). Radikal bebas memiliki sifat reaktivitas yang tinggi, karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal oleh karena hilangnya atau bertambahnya satu elektron pada molekul lain. ROS merupakan radikal bebas yang berperan penting dalam menimbulkan stress oksidatif serta kerusakan oksidatif dengan mengubah lipid, protein serta DNA (Suryohudoyo, 2000).

Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam tubuh sistem biologi tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau reactive oxygen spesies (ROS). Radikal merupakan hasil pemecahan hemolitik dari ikatan kovalen suatu molekul atau pasangan elektron bebas suatu atom. Ros merupakan bagian dari hasil metabolisme sel normal atau sel yang terpapar dari zat-zat lain yang menyebabkan terjadinya inflamasi. ROS sebagian besar merupakan hasil dari respon fisiologis (ROS endogen) yaitu hasil metabolisme sel normal dan sebagian kecil merupakan paparan dari luar tubuh (ROS eksogen) yaitu oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, jamur, bakteri dan virus (Parwata, 2016).

ROS terdiri dari superoksida (O_2), hidroksil (OH), peroksida (ROO), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen ($1O_2$), oksida nitrit (NO), peroksinitrit (ONNO), hipoklorit (HOCl) dan hasil oksida lemak pada makanan. Superoksida akan diubah menjadi radikal hidroksil (OH). Radikal hidroksil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksida lipid pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. Keadaan ini kalau dibiarkan terus menerus akan menyebabkan ketidak seimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen yang dikenal dengan stress oksidatif (Held, 2015).

Sumber radikal bebas berasal dari faktor internal (enzimatis) dan faktor eksternal (non enzimatis). Faktor internal, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh. Secara alamiah radikal bebas dibentuk dalam tubuh makhluk hidup termasuk manusia, binatang dan tumbuhan. Dalam kondisi normal jumlah radikal bebas tersebut berada dalam keseimbangan atau terkendali (Sudiana, 2017).

2.1.4 Jenis radikal bebas

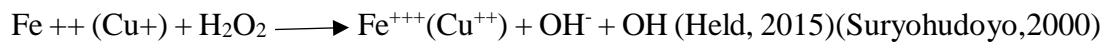
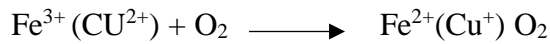
Radikal bebas dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis yaitu *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), *Reactive Nitrogen Spesies* (RNS), dan *Reactive Chlorine Spesies* (RCS). Secara umum ROS terdiri dari atas spesies radikal bebas dan reaktif yang mampu menghasilkan produk yang dapat menyebabkan kerusakan protein, lemak, asam nukleat dan karbohidrat. Anion superoksida (O_2), Hidroksil (OH), dan Nitrit Oksida (NO) merupakan radikal bebas yang penting dalam tubuh manusia dan memproduksi lebih banyak radikal bebas terutama dari asam lemak tidak jenuh (P.P. Singh *et al*, 2009).

1. Reactive Oxygen Spesies (ROS)

ROS merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal bebas. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O_2^-), *hydroxyl radicals* (OH), *peroxyl radicals* (RO $_2$). ROS yang bersifat non radikal antara lain : *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *organic peroxides* (ROOH). Bentuk radikal bebas yang lain adalah *hydroperoxyl* (HO $_2$), *alkoxyl* (RO), *carbonate* (CO_3), *carbodioide* (CO), *atomic chloride* (Cl), *nitrogen dioxide* (NO_2) (Halliwell dan whiteman, 2004). Produksi oksigen yang bersifat radikal tersebut merupakan racun bagi seluruh spesies aerob. Molekul tersebut diproduksi sebagai produk sampingan selama transpor elektron mitokondria respirasi aerobik atau dengan enzim oksidoreduktase dan logam katalis oksidasi, yang berpotensi menyebabkan sejumlah kerusakan (Held, 2015).

Radikal bebas dan ROS yang dapat dibentuk di dalam sel eritrosit adalah O_2^- , H_2O_2 dan peroksil (ROO). Superoksida di dalam eritrosit terbentuk karena proses autoksidasi hemoglobin (Hb) menjadi metHb (metyoglobin). Ion Fe^{2+} dari HB sangat rentan terhadap oksidasi oleh radikal bebas misalnya O_2^- sehingga terbentuk metHb yang tidak mampu mengangkut oksigen. Dalam keadaan normal hanya sedikit terbentuk metHb karena terdapat sistem yang efektif untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Superoksida terbentuk dari reaksi enzimatik yang dikatalis oleh flavin oksidase, xantin oksidase, monominase, oksidase, autoksidase tiol. Radikal anion superoksida akan sangat berbahaya apabila terdapat bersama-sama dengan hidrogen peroksida karena akan menghasilkan radikal hidroksil, dengan reaksi sebagai berikut :

$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH$ (reaksi Haber-Weiss), reaksi ini akan memerlukan ion Fe^{3+} dan CU^{2+} dan terjadi melalui dua tahap :



2. Reactive Nitrogen Spesies (RNS)

RNS merupakan molekul pro inflamasi yang kuat dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan serta dapat mengoksidasi protein dan asam nukleat. RNS dapat terbentuk melalui reaksi NO dengan radikal superoksida (O_2^-) sehingga terbentuk peroksinitrit (ONOO^-). Peroksinitrit mampu menjadi mediator penting dalam proses biologis, fisiologis, dan patologi tubuh. NO memiliki 2 peran., sebagai vasodilator untuk reaksi otot polos, neurotransmitter, penghambat adhesi, aktivasi dan agregasi trombosit, sitoproteksi, transduksi sinyal dan antioksidan, tetapi apabila diproduksi berlebihan terutama yang diproduksi Inos akan bersifat neurotoksik. Toksisitas NO berkaitan dengan mekanisme terjadinya kerusakan DNA, pembentukan peroksinitrit dan kehilangan energi. RNS merupakan molekul proinflamasi yang kuat dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan serta dapat mengoksidasi protein dan asam nukleat (Power dan Jackson, 2008).

2.1.5 Efek radikal bebas dalam tubuh

Radikal bebas dalam tubuh merupakan hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olah raga yang berlebihan, peradangan dan terpapar polusi (asap kendaraan, asap rokok, makan, logam berat dan radiasi matahari). Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sel disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi lebih stabil, tetapi molekul sel tubuh yang diambil elektronnya akan berubah dan bila tidak terhentikan akan menimbulkan stres oksidatif yang menyebabkan suatu peradangan, kerusakan DNA atau sel dan berbagai penyakit seperti penuaan dan penyakit

degeneratif lainnya (Parwata, 2016).

Reaksi-reaksi radikal dalam tubuh merupakan penyebab atau mendasari berbagai keadaan patologis suatu penyakit. Diantara senyawa ROS, radikal hidroksil (OH) merupakan radikal bebas yang paling efektif atau berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil (OH) merupakan radikal bebas yang paling reaktif atau berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil (OH) dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan sel yaitu : 1) asam lemak tak jenuh jamak (PUFA) yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, 2) DNA, yang merupakan piranti genetik dari sel, 3) Protein, yang memegang berbagai peran penting enzim, reseptor, antibodi dan pembentukan matriks serta sitoskeleton (Power dan Jackson, 2008).

2.1.6 Sumber-sumber radikal bebas

Sumber radikal bebas ada dua yaitu sumber eksogen dan endogen. Sumber eksogen berasal dari luar tubuh seperti polutan udara, radiasi, zat-zat kimia, karsinogenik, asap rokok, bakteri, logam berat, virus dan efek obat (obat anestesi dan pestisida). Sumber endogen yaitu radikal bebas yang merupakan hasil metabolisme normal dalam tubuh manusia seperti proses oksidasi makanan, proses oksidasi xantin dan olah raga yang berlebihan (Murry *et al*, 2003).

Sumber lain dari ROS dan RNS dapat terbentuk dari proses inflamasi. Pembentukan ROS dan RNS dapat terjadi pada proses metabolisme dimana terjadi kebocoran O₂ yang pada proses selanjutnya menjadi radikal O₂, radikal ONOO, OH dan radikal yang lain. Radikal OH akan memperoksidasi lemak sehingga menjadi radikal baru LO atau LOO. Pelatihan fisik memulai respon fisiologi dan biokimia yang

kompleks. Setiap gerakan yang otot yang cepat dimulai dengan metabolisme anaerob. Tenaganya berasal dari pemecahan ATP dengan hasil ADP atau AMP dan berlangsung di mitokondria. Pelepasan energi disertai dengan meningkatnya aliran elektron dalam rangkaian respirasi mitokondria sehingga pembentukan oksigen reaktif (O_2) dan H_2O_2 dalam upaya pembentukan ATP. Radikal bebas dapat dihasilkan pada proses terbentuknya asam urat yang akan dikatalis oleh enzim xantin oksidase. Dalam proses ini akan dihasilkan radikal superoksida (O_2), Proses ini terjadi pada mitokondria (Parwata, 2016). Radikal bebas juga dapat dihasilkan pada proses inflamasi yaitu pada proses perubahan NADPH menjadi NADP dengan katalis NADP oksidase. Dalam proses ini terjadi kebocoran O_2 yang selanjutnya berubah menjadi radikal superoksida (O_2) yang dapat merangsang terbentuknya pro inflamasi seperti $TNF-\alpha$ dan IL-6, Proses metabolisme ini biasanya terjadi pada sitoplasma (Held, 2015).

2.1.7 Stres Oksidatif

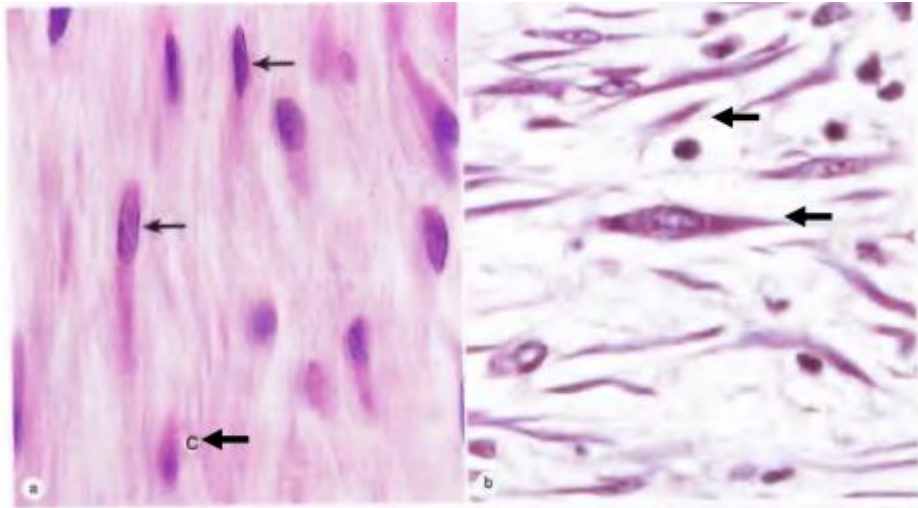
Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan yang terjadi secara terus menerus antara paparan ROS dan RNS yang melebihi antioksidan. Stres oksidatif cenderung diartikan sebagai suatu proses yang menimbulkan gangguan mekanisme pertahanan antioksidan tubuh yang merusak komponen vital seluler. Keadaan tersebut sebagai akibat ketidakseimbangan antara paparan ROS yang berlebihan dan pertahanan antioksidan endogen tidak kuat. Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx) dan catalase (CAT) disebut stres oksidatif. Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya sel yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti penuaan dini, jantung, katarak, kanker dan penyakit degeneratif

lainnya (Parwata, 2016).

2.1.8 Fibroblast

Fibroblast merupakan salah satu sel yang menyusun jaringan ikat dilapisan dermis kulit (Eroschenko, 2010). Dermis terdiri dari dua lapisan yaitu papillary dermis di bagian superficial dan reticular dermis di bagian dalam. Di papillary dermis terdapat kolagen, elastin, fibrous, dan ground substance (mukopolisakarida, asam hyaluronat, kondroitin sulfat), serta kaya akan mikrosirkulasi. Pada reticular dermis terdapat kumpulan kolagen yang lebih kasar dengan serabut-serabut elastin yang tersebar. Sel utama pada lapisan ini adalah sel fibroblast, yang akan menghasilkan kolagen (70-80%) untuk kekenyalan, elastin (1-3%) untuk elastisitas, dan proteoglikan untuk kelembaban. Fibroblast juga menghasilkan enzim seperti kolagenase dan stromelysin. Sel imun seperti sel mast, polimorfonuklear leukosit, limfosit, dan makrofag terdapat pada lapisan dermis (Khazanchi, 2007; Scott and Bennion, 2011).

Fibroblast dibagi kedalam dua bentuk berdasarkan tahapan aktivitas yang dialaminya. Istilah fibroblas sendiri merupakan fibroblast dengan aktivitas sintesis yang tinggi. Fibroblast yang in aktif biasa dikenal dengan istilah fibrosit. Kedua bentuk sel ini berbeda secara morfologinya (gambar 2.1). Fibroblast memiliki bentuk gelondong dengan inti aktif yang besar dan sitoplasma eosinofilik, sedangkan fibroblas inaktif atau fibrosit memiliki ukuran yang lebih kecil dibanding fibroblast, dengan inti yang kurang mencolok. (Junqueira, 2007).



Gambar 2.1. Fibroblas.Jaringan ikat dengan berkas kolagen parallel yang sedang dibentuk. a) Sel Fibroblas b) Fibroblas aktif dan inaktif (Junquiera, 2007).

2.1.9 Proses penuaan fibroblast

Penuaan fibroblast sering dikaitkan dengan fenomena penurunan produksi faktor pertumbuhan. Platelet derived growth factor (PDGF) merupakan faktor pertumbuhan yang utama bagi fibroblast. PDGF akan berikatan dengan salah satu atau kedua reseptor PDGF-a dan PDGF-b. Ikatan antara ligan dan reseptor akan menginduksi berbagai jalur pengiriman sinyal, diantaranya mitogen-activated protein (MAP), Phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase/Akt, dan Janus kinase. Saat proses penuaan terjadi, aktivitas pengiriman sinyal melalui berbagai jalur diatas akan mengalami penurunan sehingga berdampak pada penurunan proliferasi fibroblast. Fibroblast kulit mengalami penuaan melalui berbagai mekanisme diantaranya kerusakan DNA, pemendekan telomer, gangguan pada pengolahan post-transcriptional pra-mRNA, alterasi epigenetik, hilangnya proteostasis, serta kerusakan dan disfungsi dari mitokondria (Tigges, et al., 2014).

Proses penuaan pada kulit ditandai dengan berbagai perubahan baik yang bersifat fungsional maupun struktural, salah satunya adalah penurunan kapasitas

pertumbuhan (konfluenitas) dan viabilitas sel fibroblast. Penurunan proliferasi sel fibroblast dipengaruhi oleh radikal bebas. Terjadinya radikal bebas karena paparan ROS secara terus menerus, mengakibatkan antioksidan yang ada didalam tubuh tidak seimbangan. Ketidak seimbangan antara paparan ROS dan antioksidan yang ada didalam tubuh dapat menghambat konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast. Penurunan proliferasi sel fibroblast dapat meningkatkan matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) dan hilangnya prokolagen tipe 1 (Boom park *et al*, 2017). fibroblast dermal mengalami kerusakan yang akumulatif sehingga mengarah kepada disfungsi sel. Disfungsi sel fibroblast beserta matriks ekstraseluler dermal akan memberikan tanda klinis penuaan seperti kerutan pada kulit. Tanda klinis tersebut membuat fibroblast dianggap sebagai obyek yang sesuai dalam mengamati proses penuaan pada tingkat seluler (Tigges, et al., 2014).

Antioksidan mampu menetralkan paparan ROS yang terjadi secara terus menerus, sehingga memicu peningkatan konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast. Peningkatan proliferasi sel fibroblast dapat mempengaruhi transkripsi MMP dengan menekan aktivasi AP-1 secara bersamaan mengembalikan reduksi induksi radikal bebas pada prokolagen tipe-1 dan ekspresi TGF- β 1 dengan mengatur smads, Sehingga mengurangi tanda-tanda penuaan (photoaging) hilang (Eunson Hwang *et al*, 2017).

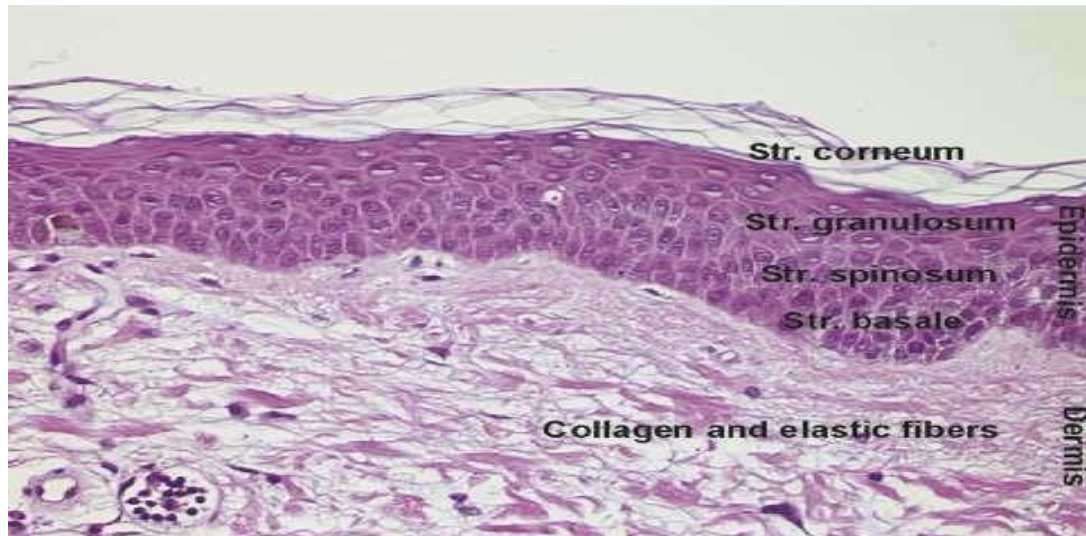
2.1.10 Kolagen dan degradasinya oleh kolagenase

Kolagen merupakan protein tripel heliks yang terdapat di seluruh bagian tubuh, dan berfungsi sebagai pengikat jaringan, perlekatan sel, migrasi sel, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), morfogenesis jaringan, dan perbaikan jaringan. Kolagen pada kulit merupakan kolagen tipe I, III, V, dan VI yang membentuk struktur

horizontal di dermis, diselingi oleh serat elastin. Kolagen tipe 1 adalah jenis yang paling banyak di jaringan ikat kulit. Proteoglikan terutama asam hialuronat merupakan substansi amorf yang di sekelilingnya terdapat serat kolagen dan serat elastin (Scott and Benion, 2011). Serat kolagen berfungsi untuk memberi kekuatan, integritas struktural, dan ketahanan pada kulit (Kadler *et al.*, 2007; Draelos, 2016).

Kolagen 1 disintesis di sel fibroblast melalui dua proses, yaitu proses di dalam sel dan di luar sel. Pada proses intrasel, mula-mula terbentuk prokolagen berupa dua rantai peptida alpha pada translasi di ribosom sepanjang retikulum endoplasma kasar (RER). Kemudian rantai polipeptida dilepaskan ke lumen RER. Sinyal peptide dilepaskan ke RER, sehingga rantai peptida menjadi rantai pro-alpha. Selanjutnya terjadi proses hidrosilasi lisin dan prolin asam amino di lumen, dengan kofaktor asam askorbat. Kemudian residu hidrosilisin mengalami glikosilasi. Di dalam retikulum endoplasma terbentuk tripel alpha helik. Kemudian prokolagen dieksositosis ke badan golgi. Pada proses ekstrasel, prokolagen yang sudah dieksositosis selanjutnya diubah menjadi tropokolagen oleh prokolagen peptidase. Beberapa tropokolagen membentuk fibril kolagen melalui cross-linking kovalen. Beberapa fibril kolagen membentuk serabut kolagen. Kolagen selanjutnya menempel pada membran sel melalui beberapa protein, antara lain fibronektin dan integrin, ditunjukkan gambar 2.2 (Mescher, 2010).

Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) atau kolagenase merupakan suatu proteinase ekstraselular yang dominan pada kulit, dan berperan dalam pemecahan kolagen tipe 1 secara fisiologi. MMP tersusun dari propeptida, katalitik, dan hemopexin. MMP memecah kolagen menjadi menjadi $\frac{3}{4}$ dan $\frac{1}{4}$ fragmen. MMP-1 memecah kolagen setelah residu ke 775 (Gly), dalam sekuen rantai GIA-alpha 1 dan rantai GLL-alpha2 (Chang and Buehler, 2014).



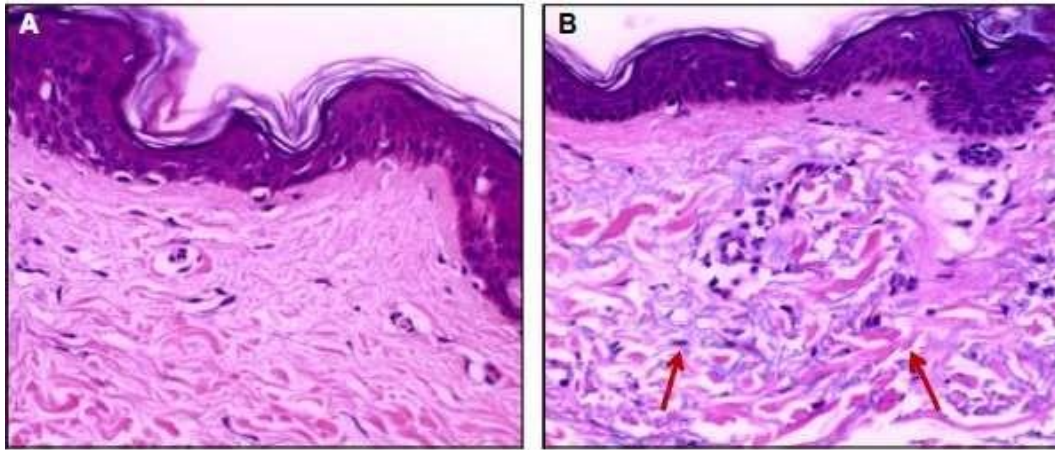
Gambar 2.2 Histologi kolagen dermis dengan pewarnaan HE (Emmert *et al.*, 2013)

Kolagen akan tergradasi oleh kolagenase karena dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik antara lain genetik dan hormon, faktor ekstrinsik meliputi sinar ultraviolet, polusi, dan diet yang tidak sehat. Produksi kolagen juga dipengaruhi oleh hormon estrogen. Estrogen dapat meningkatkan sintesis kolagen. Dengan adanya degradasi kolagen oleh kolagenase dapat mempengaruhi kekenyalan kulit sehingga kulit menjadi keriput (Farage *et al.*, 2008).

2.1.11 Elastin dan degradasinya oleh elastase

Serabut elastin yang berada di lapisan dermis lebih sedikit dibandingkan kolagen, namun mempunyai peranan penting dalam menjaga elastisitas dan ketahanan kulit, menjaga agar kulit dapat kembali ke bentuk semula dengan segera setelah kulit diregangkan. Secara histologi, serabut elastin dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu oxytalan, elaunin, dan elastic. Oxytalan berada di permukaan paling luar, sangat tipis, dan terbentang dari perpendicular ke dermal-epidermal junction. Elaunin dan elastic berada di lapisan yang lebih dalam serta lebih tebal. Ketika kulit mengalami photoaging, elastin berubah bentuk dan fungsinya menjadi jaringan

elastosis, di mana serabut elastin berubah menjadi tebal dan tidak teratur. Jaringan elastosis dapat menimbulkan manifestasi klinis penuaan kulit, yaitu kulit tampak kendur atau berkurang elastisitasnya, ditunjukkan gambar 2.3 (Menon, 2015).



Gambar 2.3. Perubahan susunan serat elastin karena photoaging. (A) Area kulit yang tidak terpapar sinar matahari. (B) Area kulit yang terpapar sinar matahari. Tanda panah merah menunjukkan ketidakteraturan serat elastin (Weihermann *et al.*, 2016)

2.1.12 Teori penuaan (aging)

Penuaan atau aging merupakan proses penurunan fungsi biologis dari usia kronologis. Proses penuaan ditandai oleh penurunan energi seluler yang menurunkan kemampuan sel untuk memperbaiki diri. Terjadi dua fenomena, yaitu penurunan fisiologis (kehilangan fungsi tubuh dan sistem organnya) dan peningkatan penyakit (Fowler, 2003 dalam Wahyuningsih, 2011). Menurut *American Academy of Anti-Aging Medicine* (A4M), penuaan adalah kelemahan dan kegagalan fisik-mental yang berhubungan dengan aging normal disebabkan oleh disfungsi fisiologis, dan dalam banyak kasus dapat diubah dengan intervensi medis yang tepat (Klatz, 2003 dalam Wahyuningsih, 2011).

Menurut Jin (2010) dan *American Federation for Aging Research* (2011), Teori penuaan (aging) pada manusia terdiri dari 8 teori, sebagai berikut:

1. Teori umur yang terprogram

Organ tubuh manusia sudah memiliki program genetik dalam DNA masing-masing yang akan mengatur fungsi fisik dan mental. Program ini secara otomatis akan menentukan pada usia berapa manusia akan menua dan pada usia berapa manusia pada akhirnya akan mati.

2. Teori endokrin

Hormon bertindak sebagai jam biologis yang mengendalikan laju penuaan. Penuaan diatur secara hormonal, dan terjaganya jalur yang mengkode insulin / IGF-1 memegang peranan kunci dalam pengaturan penuaan secara hormonal.

3. Teori imunologi

Imunitas tubuh secara terprogram mengalami penurunan seiring waktu, sehingga tubuh semakin rentan terkena infeksi yang akhirnya mengarah pada proses penuaan dan kematian. Keefektifan sistem imunitas tubuh mencapai puncaknya ketika usia pubertas, dan secara bertahap menurun bersama pertambahan usia. Saat menua antibodi tubuh semakin lemah sehingga semakin sedikit penyakit yang dapat diserangnya, tekanan selular meningkat dan berakhir dengan kematian.

4. Teori keausan

Sel-sel tubuh memiliki bagian vital yang jika dipakai berulang dan terus menerus, maka akan mengalami keausan yang menyebabkan sel-sel rusak, yang selanjutnya terakumulasi menjadi kerusakan organ, kemudian kerusakan tubuh secara keseluruhan.

5. Teori kecepatan hidup

Semakin besar kecepatan metabolisme oksigen basal pada manusia, semakin pendek rentang hidupnya. Semakin cepat manusia bekerja, semakin besar energi yang

digunakan, dan tubuh semakin cepat mengalami kerusakan.

6. Teori ikatan silang

Ikatan silang antara protein intraseluler dan interseluler semakin meningkat secara progresif sejalan dengan bertambahnya usia. Misalnya ikatan silang pada serabut kolagen, yang akan menyebabkan penurunan elastisitas dan kelenturan kolagen pada membran basalis, dan berakibat rusaknya fungsi organ.

7. Teori radikal bebas

Superoksida dan radikal bebas lainnya dapat menyebabkan kerusakan makromolekul, seperti asam nukleat, gula, lipid, dan protein. Radikal bebas yang meningkat dapat menyebabkan kerusakan sel, kemudian jaringan, sehingga fungsi organ menjadi rusak. Sinyal *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan enzim/jalur gen terpenting yang mengkode penuaan sel (*cell senescence*) dan organ.

8. Teori kerusakan somatik DNA

Kerusakan DNA terjadi secara terus menerus dalam sel organisme hidup. Beberapa kerusakan ini dapat diperbaiki, namun akumulasi kerusakan seperti DNA polimerase tidak dapat diperbaiki karena kecepatan mekanisme perbaikan tidak secepat proses polimerase. Kerusakan DNA dapat membuat sel tidak dapat membelah diri. Mutasi genetik terjadi dan terakumulasi sejalan dengan pertambahan usia, dan menyebabkan malfungsi sel.

2.1.13 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti penuaan, kardiovaskular, karsinogenesis dan penyakit lainnya. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan

mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Senyawa ini mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa gangguan sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Murry *et al*, 2003).

Tubuh manusia telah mempersiapkan diri untuk melawan radikal bebas eksogen dan endogen. Penangkal tersebut berupa sistem antioksidan yang terdiri dari 3 golongan :

1. Antioksidan primer

Antioksidan primer bekerja sebagai pemutus reaksi berantai, bereaksi dengan radikal lipid, mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil dan sebagai antioksidan preventif dengan mengurangi kecepatan reaksi inisiasi, mencegah autooksidasi lipid melalui pemberian atom hidrogen yang cepat kepada radikallipid. Antioksidan yang termasuk dalam golongan ini adalah fenolitik seperti butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butyl hydroxytoluene (TBHQ), butylated hydroxytoluene (BHT), senyawa alami flavanoid (Suryohudoyo, 2000).

2. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder bekerja memperlambat laju autooksidasi melalui berbagai mekanisme yaitu melalui pengikatan ion logam, penangkapan oksigen, penguraian hiperoksida menjadi produk non radikal, penyerapan radiasi UV, deaktivasi singlet oksigen. Yang masuk golongan ini adalah asam askorbat, askorbil palmitat, asam eritorbat, natrium eritorbat sebagai antioksidan sekunder untuk menstabilkan produk pangan dan pakan berlemak (Widowati *et al*, 2005).

3. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier atau repair enzyme yaitu antioksidan yang berfungsi memperbaiki jaringan tubuh yang rusak oleh radikal bebas, antioksidan tersebut adalah metionin sulfosida reduktase, DNA *repair enzymes*, *protease*, *transferase* dan *lipase* (Murry *et.al* 2003).

Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan manusia dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu :

1. Antioksidan yang sudah diproduksi di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan antioksidan endogen atau enzim antioksidan SOD, GPx dan CAT. Pada sistem biologi berbagai macam radikal bebas akan berperan dalam oksidasi lipid. Radikal superoksida (O₂⁻) yang dihasilkan xanthine oksidase menjadi hidrogen peroksida dapat dirubah oleh enzim SOD (superoksida dismutase), enzim katalase berperan penting dalam merubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.
2. Antioksidan sintesis yang dapat digunakan pada produk pangan seperti Butil Hidroksil Anisol (BHA), Butil Hidroksil Toluen (BHT), propil galat dan *Tert-Butil Hidroksil Quinon* (TBHQ).
3. Antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kulit kayu, akar, daun, buah, biji dan serbuk sari yang mengandung vitamin A, vitamin C, Vitamin E dan senyawa fenolik (Flavanoid)(Murray *et al*, 2009).

2.1.14 Antioksidan enzimatik

Enzim antioksidan atau antioksidan endogen enzimatik adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia sebagai penangkal radikal bebas eksogen maupun radikal bebas endogen seperti SOD, GPx, dan CAT. Antioksidan enzimatik disebut

juga antioksidan sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas (Power dan Jackson, 2008).

2.1.15 Antioksidan alami

Antioksidan alami pada umumnya berupa vitamin C, Vitamin E, karotenoid, senyawa fenolik dan polifenolik yang dapat berupa flavanoid, turunan asam sinamat, kuomarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavanoid yang memiliki aktivitas antioksidan menjadi flavon, flavanol, isoflavon, katekin, flavonol dan kalkon. Turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat dan lain-lain. Hal ini disebabkan karena gugus $-OH$ dan ikatan rangkap dua ($\geq C=C \leq$) yang dimiliki oleh senyawa-senyawa diatas (Murry *et al*, 2009). Gugus aktif yang umum berfungsi sebagai penangkap dan penghambat reaksi radikal bebas selanjutnya adalah gugus-gugus $-OH$ dan ikatan rangkap dua ($\geq C=C \leq$) menjadi stabil dan terbentuk radikal baru yang kurang reaktif (Murray *et al*, 2009).

2.1.16 Peran antioksidan non enzimatik dalam mencegah stres oksidatif

Senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak suatu tanaman diduga fungsinya dapat menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal-radikal bebas, baik yang eksogen maupun endogen. Reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas khususnya radikal bebas OH dapat merusak membran sel normal disekitarnya dan merusak komposisi DNA sehingga dapat menyebabkan terjadinya suatu mutasi. Mutasi atau kerusakan komposisi DNA dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit degeneratif seperti penuaan dini, kanker, jantung dan lain-lain (Murray *et al*, 2009).

Flavanoid dapat memberi efek antioksidan dengan mencegah generasi ROS, langsung menangkap ROS atau secara tidak langsung terjadi peningkatan enzim

(Akhlaghi dan Bandy, 2009). Flavanoid dapat menangkap secara langsung superoksida dan peroxyinitrite. Melalui penangkapan superoksida, flavanoid meningkatkan bioviabilitas NO dan menghambat pembentukan peroxyinitrite. Flavanoid dapat menghambat terjadinya kerusakan DNA akibat reaksi HO dengan basa-basa nitrogen dari DNA dan merangsang terbentuknya antioksidan enzimatik seperti SOD, katalase dan GPx (Parwata, 2009).

2.1.17 Penjelasan Al – qur’an tentang semua ciptaan Allah dimuka bumi ini tidak ada yang sia-sia

Manusia dan tumbuhan sangat erat kaitannya dengan kehidupan. Semua ciptaan Allah dimuka bumi ini tidak ada yang sia-sia, namun masih banyak disekitar kita tumbuhan yang belum diketahui manfaatnya. Keberadaan tumbuh – tumbuhan merupakan berkah dan nikmat yang Allah SWT berikan kepada seluruh makhluk yang ada dimuka bumi. Allah berfirman dalam surat ‘Abasa ayat 27-32 :

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا وَعِنَبًا وَقَضْبًا وَرَيْثُونًا وَنَخْلًا وَحَدَائِقَ غُلْبًا وَفَاكِهَةً وَأَبًّا مَنَاعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ^{٢٧}

Ayat diatas menerangkan kenikmatan Allah diberikan dalam bentuk biji-bijian, sayur-sayuran, buah-buahan dan rumput-rumputan yang bisa dijadikan makanan bagi manusia dan ternak. Setiap unsur makanan didalamnya terkandung manfaat yang sangat besar bagi manusia termasuk tanaman pegagan. Pegagan merupakan jenis tanaman yang sangat besar manfaatnya untuk mengobati berbagai jenis penyakit termasuk penuaan, jantung, kanker dan berbagai penyakit degeneratif lainnya.

2.1.18 Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan hidup liar di lingkungan sekitar. Keberadaan pegagan yang dapat dengan mudah ditemukan, menjadikan pegagan sebagai tumbuhan yang sering digunakan

masyarakat untuk berbagai keperluan, misalnya digunakan sebagai bahan sayuran maupun sebagai obat-obatan. Klasifikasi pegagan (*Centella asiatica*)



Gambar 2.4 Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*) (Sutardi,2016)

Klasifikasi tanaman pegagan (*Centella asiatica*) :

Kingdom	:	Plantae
Division	:	Tracheophyta
Sub Division	:	Spermatophyta
Class	:	Magnoliopsida
Order	:	Apiales
Family	:	Apiaceae
Genus	:	Centella
Spesies	:	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban

Pegagan dikenal dengan nama ilmiah *Centella asiatica*, merupakan tanaman yang termasuk dalam keluarga *Apiaceae* atau adas-adasan yang berasal dari negara Asia seperti India, Sri Lanka, Cina, Indonesia dan Malaysia. Pegagan juga dikenal dengan *Gotu kola*, *Asiatic pennywort*, *Indian pennywort*, *Indian water navelwort*, *wild violet*, and *tiger herb* oleh masyarakat asing. Di Indonesia sendiri, pegagan memiliki berbagai macam nama, yakni pegago di daerah Minangkabau; antanan gede dan antanan rambat

di wilayah Sunda; dan di wilayah Jawa dikenal dengan ganggagan, kerok batok, pantegowang, panegowang, rendeng, calingan rambat, pegagan, atau gagan-gagan. Pegagan juga sering disebut dengan daun kaki kuda, penyebutan ini dikarenakan bentuk dari daun pegagan yang menyerupai telapak kaki kuda (Lasmadiwati, 2003). Pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai batang pendek, sehingga dapat dianggap tidak mempunyai batang, dari batang tersebut tumbuh geragih atau stolon yang tumbuh secara horisontal di atas tanah dan berbuku-buku. Dari buku tersebut keluar akar dan tunas yang kemudian tumbuh menjadi tanaman baru (Reniza, 2013).

Pegagan (*Centella asiatica*) ditemukan di seluruh wilayah tropis dan sub tropis dengan ketinggian 600 m. pegagan juga diketahui hidup pada ketinggian 1.550 m di Sikkim dan 1.200 m di Gunung Abu (Rajasthan) India. Pegagan dapat tumbuh subur di tempat-tempat teduh, berawa, lembab dan basah seperti sawah, tepi sungai hingga membentuk seperti karpet yang hijau pekat (Singh, 2010).

2.1.19 Kandungan pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan, seperti anti penuaan, menjaga dan meningkatkan daya ingat, menurunkan tekanan darah, serta mencegah terjadinya keloid pada bekas luka. Hal ini dikarenakan pegagan mengandung berbagai senyawa aktif. Sihombing (2015) dalam jurnalnya menyatakan bahwa pegagan mengandung senyawa aktif diantaranya adalah triterpenoid saponin dengan unsur utamanya terdiri dari asiatikosida dan madekassosida, genin triterpen, minyak esensial, flavonoid, fitosterol, dan gula. Bahan aktif lainnya adalah tanin, asam amino, asam lemak, alkaloid, dan garam-garam mineral. Sutardi (2016) menambahkan, pegagan juga mengandung asam brahmik, asam madasiatik, meso-inositol, sentelosida, karotenoid, hidrokotilin, vellarin, tanin

serta garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, dan besi, fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), asam amino dan vitamin B, senyawa pahit vellarine, dan senyawa samak. Adapun Khusnawati (2015) menyatakan, Pegagan juga diketahui mengandung senyawa aktif lainnya yakni vallerin, alkaloid, dan glikosida triterpen.

Senyawa aktif terpenting yang terkandung dalam pegagan adalah triterpenoid dan saponin, yang meliputi senyawa asiatikosida, sentelosida, madekosida, dan asam asiatik serta komponen lain seperti minyak volatil, flavonoid, tanin, fitosterol, asam amino, dan karbohidrat. Semua kandungan bioaktif tanaman pegagan merupakan antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh manusia dalam meningkatkan sistem imun dan menjaga sel-sel tubuh dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Hebbar, 2019).

Triterpenoid merupakan senyawa paling penting yang terkandung dalam tanaman pegagan. Triterpenoid berfungsi merevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah menjadi lancar. Asiatikosida merupakan derivat dari senyawa triterpenoid yang berfungsi untuk menguatkan sel-sel kulit dan meningkatkan perbaikannya, menstimulasi sel darah dan sistem imun, serta sebagai antibiotik alami (Khusnawati, 2015).

2.1.20 Mafaat pegagan (*Centella asiatica*)

Menurut Orhan (2012) pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai berbagai manfaat bagi kesehatan, diantaranya : mengobati luka luar, anti-inflamasi, dan antioksidan yang tinggi. Kemampuan pegagan (*Centella asiatica*) dalam kesehatan tidak lepas dari senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. *Asiaticoside* dan *madecassic acid* merupakan senyawa antioksidan yang mempunyai manfaat sebagai

agen penyembuh luka (Seevaratnam, 2012), sedangkan brahmoside mampu memperlancar aliran darah (Lachman, 2009). *Centellasaponin* merupakan senyawa pelindung kulit yang telah terbukti mampu menginduksi sintesis kolagen tipe 1 pada sel fibroblast kulit manusia (Seevaratnam, 2012).

Asiatic acid atau asam asiatik merupakan senyawa khas yang memiliki peran sebagai agen neuroprotective, fungsi ini dikarenakan asam asiatik mampu menjaga aliran darah menuju otak dengan cara melindungi fungsi mitokondria. Senyawa ini juga diketahui mampu merusak membran sel pada bakteri dengan cara meningkatkan pelepasan ion kalium dan nukleotida pada *Staphylococcus aureus* sehingga dapat dikatakan bersifat sebagai antimikroba (Junwey, 2018). Selain itu, senyawa ini juga mempunyai sifat sebagai anti-diabetes, anti-kanker, dan juga anti- inflamasi.

Senyawa-senyawa khas pegagan merupakan derivat dari senyawa triterpenoid. Menurut Widiyati (2006) triterpenoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai aktifitas fisiologis paling tinggi sehingga seringkali dimanfaatkan sebagai obat diabetes, malaria, kerusakan hati, dan gangguan kulit. Adapun bagi tumbuhan, senyawa ini bermanfaat sebagai anti fungi, anti bakteri, insektisida dan anti virus. Adapun Lee (2015) menambahkan bahwa *benulinic acid* secara dependen menunjukkan aktivitas penghambat proliferasi dan menginduksi proses apoptosis pada neuroblastoma dan apoptosis garis sel melanoma. Menurut Hanin (2017) senyawa Fenolik merupakan golongan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respon terhadap stress lingkungan. Salah satu golongan senyawa paling besar adalah flavonoid.

2.1.21 Kultur sel

Kultur jaringan adalah menanam jaringan hidup yang diambil dari tubuh yang

masih segar atau masih hidup, ditaruh dalam larutan fisiologis atau serum darah atau medium kultur yang diinkubasi dalam jangka waktu tertentu hingga pertumbuhan sel terlihat, lalu diamati dibawah mikroskop *inverted*. Teknik kultur jaringan merupakan salah satu metode preservasi satwa langka, diperlukan pemahaman mengenai biologi dan pertumbuhan sel baik dalam lingkungan *in vivo* maupun *in vitro*. Pada dasarnya teknologi ini merupakan teknologi yang menggunakan teknik- teknik isolasi sel dari pembiakan sel *in vitro*. Menurut Wang (2004), *stem cell* memiliki pertumbuhan yang sangat potensial yang dapat berubah menjadi beberapa tipe sel yang berbeda di dalam tubuh. Bertindak sebagai sistem perbaikan untuk tubuh, secara teoritis *stem cell* dapat membelah tanpa batas untuk mengisi kembali sel –sel yang lain selama hewan atau manusia masih hidup. *Stem cell* membelah, masing – masing sel yang baru memiliki kemampuan untuk menjadi *stem cell* atau menjadi tipe sel yang lain dengan fungsi khusus yang lain, seperti menjadi sel otot, sel darah merah dan sel otak. Salah satu problem dalam aplikasi teknologi *stem cell* adalah isolasi dan kultur sel secara berkesinambungan (Juwita,2005).

Secara garis besar ada tiga pokok teknik kultur jaringan *in vitro* yaitu: (1) Persiapan dan teknik aseptik (sterilisasi), (2) Pembuatan kultur primer, serta (3) Pemeliharaan kultur, propagasi dan preservasi sel. Untuk menuju kearah tersebut perlu adanya teknik- teknik khusus yang sifatnya kompleks dan rumit. penerapan kultur primer jaringan untuk penelitian memiliki beberapa keuntungan dan kerugian. Keuntungannya adalah : faktor resiko kimiawi lingkungan dapat dikontrol (seperti pH, suhu, tekanan osmotik, kadar O₂ dan CO₂) yang dapat diatur secara tepat serta kondisi fisiologis yang dapat dipertahankan secara konstan, karakterisasi serta homogenitas sampel maksudnya adalah sampel jaringan sangat heterogen dalam komposisi sel.

Replika sampel walaupun berasal dari satu jaringan variasi dalam kandungan tipe sel sangat heterogen. Setelah menjalani 1- 2 pasase, kultur sel tetap dapat diasumsikan homogen atau paling tidak seragam. Pada setiap subkultur setiap replika akan menjadi identik, karakterisasi dari *cell lines* untuk beberapa generasi dapat diabaikan. dan ekonomis. Kerugiannya adalah : membutuhkan keahlian dan keterampilan tertentu, jumlah sel yang dihasilkan sangat terbatas, dan adanya faktor ketidakstabilan *cell line*. Agar kultur jaringan dapat memberikan hasil sesuai harapan ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, antara lain : substrat, suhu, pH dan medium. Jika kultur jaringan tidak diberi medium yang cocok maka sel- sel akan segera mati oleh autolisis, baik karena suhu maupun tekanan udara (Yatim, 1992).

Menurut Djuwita (2002) pemanfaatan teknik kultur jaringan pada dasarnya dilakukan sebagai model fungsi fisiologis *in vivo*. Dengan demikian pada kultur jaringan ataupun sel ada dua hal yang perlu diupayakan proliferasi atau multiplikasi dan fungsi ekspresi diferensiasi sel. Proses proliferasi pada dasarnya menyangkut pertumbuhan sel, pemahaman dan pengenalan yang baik terhadap siklus pertumbuhan sel serta faktor-faktor yang berperan di dalam proses pertumbuhan sel ataupun jaringan yang akan dipergunakan sangat diperlukan. Fungsi ekspresi diferensiasi sel berkait erat dengan interaksi dan komunikasi sel, karenanya pemahaman mengenai sifat-sifat sel seperti heterogenitas sel, interaksi dan komunikasi sel serta susunan tiga dimensi jaringan juga diperlukan.

2.1.22 Pertumbuhan sel

Sel yang tumbuh dalam kultur biasanya mengikuti standar yang pasti. Keterlambatan mengikuti urutan periode pertumbuhan *exponensial* disebut fase *log*. Ketika densitas sel (sel/ cm² substrat) sampai pada tingkat dimana semua permukaan

substrat terpenuhi atau ketika konsentrasi sel (sel/ ml medium) melewati kapasitas dari medium yang menyebabkan pertumbuhan berhenti atau berkurang banyak sehingga medium harus diganti lebih sering atau dilakukan subkultur (Freshney, 2000).

Menurut Budiono (2002), pertumbuhan sel dalam sistem kultur secara umum dibagi dalam 3 fase, yaitu :

1. Lag Phase

Merupakan waktu mengikuti proses subkultur dan *reseeding*, yaitu masa dimana belum terdapat peningkatan jumlah sel. Pada masa tersebut konsentrasi sel adalah sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada waktu subkultur (10^4 sel/ml). Merupakan periode adaptasi, dimana sel mengganti elemen - elemen *glycocalyx* yang hilang waktu tripsinasi, pelekatan pada substrat dan penyebaran sel. Pada masa penyebaran sitoskeleton muncul kembali. Enzim *polymerase* meningkat, diikuti dengan sintesis DNA dan protein struktural baru. Beberapa produk khusus dari sel akan menghilang dan tidak akan muncul kembali sampai proliferasi sel terhenti pada konsentrasi sel tinggi.

2. Log Phase

Merupakan periode peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen proliferasi akan terhenti setelah 1 atau 2 siklus berikutnya. Waktu *log phase* tergantung pada konsentrasi awal sewaktu dilakukan seeding, kecepatan pertumbuhan sel, serta kepekatan dimana proliferasi sel akan terhambat oleh kepekatan. Pada *log phase* fraksi pertumbuhan akan mencapai 90% - 100 %.

3. Plateu Phase

Mendekati akhir dari *log phase*, kultur menjadi konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan lingkungan

sekitarnya. Setelah mencapai konfluen kecepatan tumbuhnya akan berkurang, dan pada beberapa kasus proliferasi sel akan terhenti setelah 1- 2 siklus. Pada tahap ini kultur mencapai tahap *plateu* atau stationari, dan fraksi pertumbuhan akan turun mencapai 0% - 10 % (Djuwita,2002).

2.2 In silico

2.2.1 Bioinformatika

Secara sederhana, bioinformatika merupakan penerapan teknologi komputer yang berguna dalam memecahkan permasalahan biologis. Bioinformatika digunakan sebagai pengelola data interaksi antar protein dan struktur tiga dimensinya, cell imaging, ekspresi gen, dan lain sebagainya. Dalam penerapannya, bioinformatika membutuhkan beberapa perangkat seperti bahasa pemrograman dan juga system operasi yang dapat mendukung (Abraham, 2013).

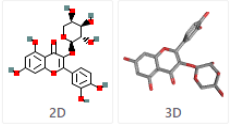
Terdapat beberapa metode yang digunakan dalam pemodelan komputer dari bioinformatika dalam proses penemuan obat, di antaranya adalah mekanika molekuler, dinamika molekuler, mekanika kuantum, dan penambatan molekuler. Mekanika molekuler merupakan metode dalam menganalisa energi pada sebuah atom yang diasumsikan dalam kondisi diam sehingga mengurangi waktu komputansi dan lebih mudah digunakan. Dinamika molekuler menggunakan pendekatan sebaliknya, metode ini memungkinkan perhitungan energi dengan asumsi atom dalam keadaan bergerak dinamis. Mekanika kuantum bekerja dengan cara menghitung energi yang digunakan menggunakan pendekatan fisika kuantum. Sedangkan penambatan molekuler bekerja dengan cara menerapkan metode simulasi grafis tiga dimensi untuk mengamati interaksi yang terbentuk antara ligan dan reseptor (Thomas, 2013).

2.2.2 Pubchem Compound

PubChem Compound adalah salah satu basis data yang terdapat dalam situs Pubchem yang dapat digunakan untuk mencari berbagai informasi mengenai senyawa aktif tanaman. Salah satu info yang terdapat dalam basis data ini adalah karakteristik, rumus kimia, berat molekul, dan lain sebagainya. PubChem Compound menyimpan berbagai macam struktur kimia dengan kandungan dan karakteristik yang khas dari PubChem Substance. Senyawa tersebut dapat dicari berdasarkan sifat kimia terukur dan digolongkan berdasarkan perbandingan struktur ke dalam kelompok yang memiliki kemiripan dan kesamaan identitas. Senyawa tersebut dihubungkan melalui PubChem Substance untuk mendapatkan informasi aktivitas biologisnya. Situs PubChem Compound adalah <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (Bolton, Wang, Thiessen, & Bryant, 2008). Tampilan dari website PubChem Compound dapat dilihat pada gambar 2.1 berikut:

Quercetin-3-O-arabinoside

Cite Download

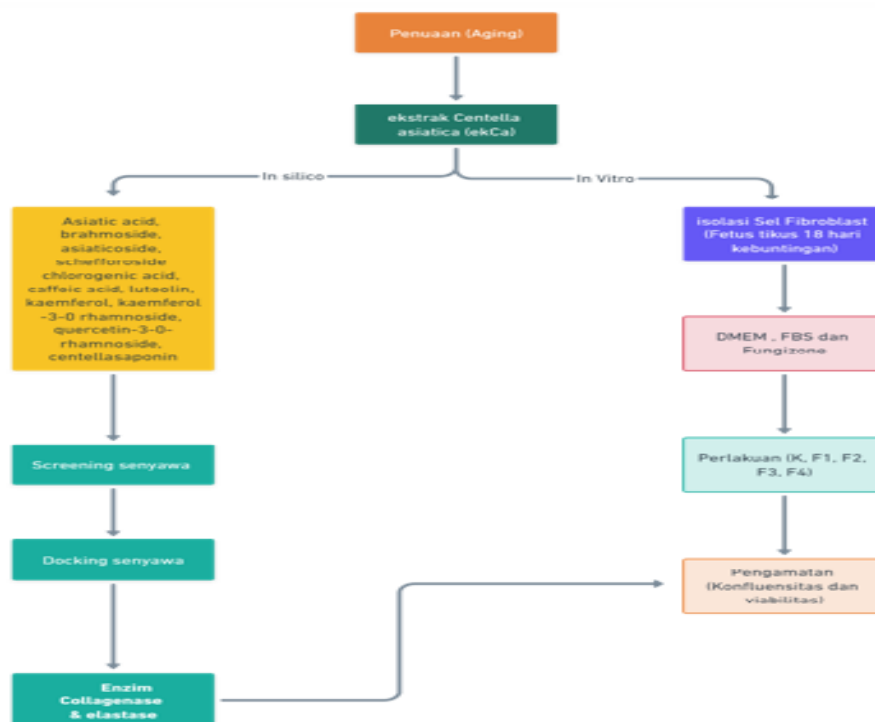
PubChem CID	12309865
Structure	 2D 3D Find Similar Structures
Molecular Formula	$C_{20}H_{18}O_{11}$
Synonyms	Quercetin-3-O-arabinoside SCHEMBL38138 CHEBI:141135 ZINC14684626
Molecular Weight	434.3
Dates	Modify Create 2022-06-18 2007-02-07

Gambar 2.5. Tampilan informasi senyawa Quercetin-3-0-arabinoside pada PubChem Compound (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

2.2.3 Swiss ADME

Swiss ADME merupakan salah satu aplikasi berbasis online yang dapat diakses secara gratis dan dikenal sebagai physicochemical descriptor dan sering digunakan untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa berdasarkan strukturnya. Keunggulan dari aplikasi ini digunakan oleh berbagai kalangan untuk melakukan pencarian mengenai potensi suatu senyawa sebagai obat dengan cara membantu memprediksi aktivitasnya berdasarkan sifat fisikokimia dan juga memprediksi sifat farmakokinetik maupun farmakodinamik. Keunggulan lain dari Swiss ADME adalah cara mempresentasikan hasil prediksi dari banyak senyawa tersebut sehingga lebih mudah dalam tahapan analisisnya dengan menampilkan Swiss target prediction yang akan menampilkan secara visual sederhana prediksi kemampuan senyawa dalam proses penghambatan enzim di dalam tubuh (Daina et al., 2016).

2.3 Kerangka konseptual



Gambar 2.6 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan :

▭ : diteliti

→ : memicu

2.3.1 Uraian kerangka konseptual

Penuaan (aging) merupakan proses fisiologi yang tidak dapat dihindari, tetapi dapat dicegah dengan cara pemberian antioksidan. Terjadinya penuaan (aging) dipengaruhi oleh adanya radikal bebas. Sumber radikal bebas ada dua yaitu : sumber eksogen dan endogen. Sumber eksogen berasal dari luar tubuh seperti polutan udara, radiasi, zat-zat kimia, karsinogenik, asap rokok, bakteri, logam berat, virus dan efek obat (obat anatesi dan pestisida). Sumber endogen berasal dari dalam tubuh. Sumber endogen yaitu radikal bebas yang berasal dari hasil metabolik normal dalam tubuh manusia seperti proses oksidasi makanan, proses oksidasi xiantin dan olahraga yang berlebihan (Murry *et al*, 2003).

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tanaman yang mempunyai manfaat sangat besar, salah satunya sebagai anti penuaan (aging). Hasil penelitian yang oleh Muchtaromah (2019) menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mengandung senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiaging, antioksidan dan anti inflamasi mampu melindungi kerusakan organ tubuh paling luar yaitu kulit, karena kulit terpapar langsung dengan lingkungan luar dan hasil reaksi metabolisme.

Pada penelitian ini untuk mengetahui efek anti penuaan (aging) ekstrak *Centella asiatica* dilakukan dengan uji in vitro dan in silico. Uji in vitro menggunakan sel fibroblast fetus tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi menggunakan media DMEM dan *penicillin streptomycin* (sebagai anti biotik) ditambah ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi yang berbeda, tetapi sebelum dikultur fetus tikus dicacah halus dan

dicuci menggunakan PBS supaya steril. Uji in vitro dilakukan untuk mengetahui konfluensitas dan viabilitas sel fibroblast fetus tikus.

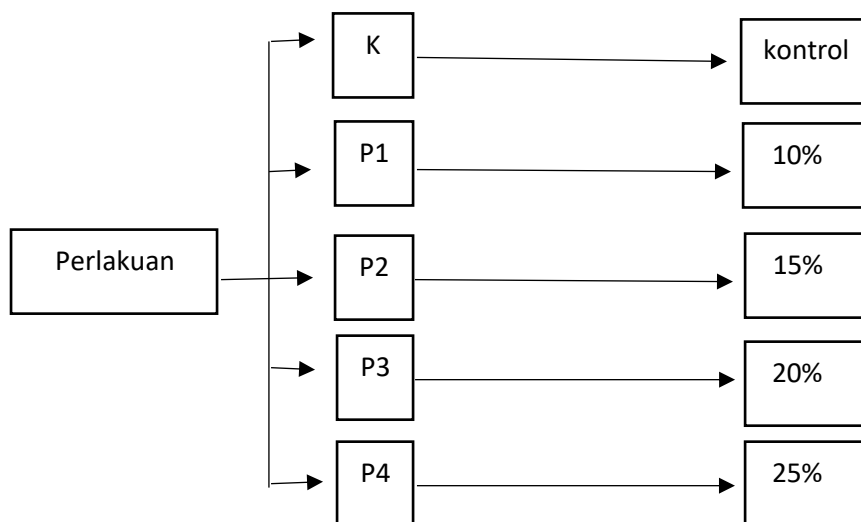
Uji In silico dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam *Centella asiatica* yang berpotensi sebagai antiaging, karena ekstrak yang digunakan uji in vitro dalam bentuk crude ekstrak sehingga belum diketahui senyawa apa yang berpotensi sebagai antiaging. Langkah pertama yang dilakukan adalah screening senyawa dengan instrumen diatas 2% melihat prosentase area senyawa tersebut, kemudian dilanjutkan Docking molekuler senyawa dengan enzim *collagenase* dan *elastase*, bertujuan untuk mengetahui besar ikatan senyawa aktif yang terkandung pada *Centella asiatica* mampu menginhibisi enzim *collagenase* dan *elastase* yang memicu penurunan kolagen dan elastisitas kulit. Dengan pemberian ekstrak *Centella asiatica* mampu mempertahankan kolagen dan elastisitas kulit. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental eksploratif di laboratorium dengan menggunakan *rancangan acak lengkap* (RAL). Tahapan awal dari penelitian ini adalah melakukan proses ekstraksi terhadap simplisia pegagan (*Centella asiatica*) yang diperoleh dari perkebunan desa kasri kecamatan Bululawang dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70% dapat menarik senyawa aktif lebih banyak dibandingkan dengan pelarut organik lainnya, memiliki titik didih rendah yaitu 79°C sehingga memerlukan panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan, bersifat polar. Pada penelitian ini menggunakan hewan coba fetus tikus dengan usia kebuntingan 18 hari, dengan 5 perlakuan masing-masing 4 ulangan.



3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan mei – juni 2022. Penelitian

dilaksanakan di Laboratorium kultur jaringan hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

3.3.1 Uji in vitro

- a. Variabel bebas : Ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi yang berbeda yaitu kontrol, P1:10%, P2:15%, P3 :20% dan P4: 25% pelarut etanol 70%.
- b. Variabel terikat : Konfluenitas sel fibroblas dan viabilitas sel fibroblas
- c. Variabel terkendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan adalah fetus yang berumur 8 hari kebuntingan.

3.3.2 uji in silico

- a. Variabel bebas : Senyawa hasil screening menggunakan PASSOnline.
- b. Variabel terikat : Enzim elastase dan collagenase
- c. Variabel terkendali : elastisitas dan collagen

3.4 Alat dan bahan

3.4.1 Uji in Vitro

Alat : Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF) (LABTECH), Mikroskop *Inverted* (Nikon TI-u), Sentrifus (Thermo Scientific), *Automatic Cell Counter* (Invitrogen Thermo Fisher), Inkubator CO² (Thermo Scientific), timbangan analitik,

micropipet, *Tissue Culture Disk* (TCD), *plate well* 98, tabung sentrifus 15 ml, tabung endorf 2 ml, filter 0,2 μ m, spuit 20 cc, tabung duran 100 ml, beaker glass 100 ml dan enlemeyer 100 ml.

Bahan : bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun pegagan (*Centella asiatica*), media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco), Trypsin (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Biowest), *Phospat Buffer Saline* (PBS) (Gibco), *Dimethyl Sufoxide* (DMSO), NaHCO₃, penicilin, streptomycin, hepes dan air steril.

3.4.2 Uji in silico

Alat : perangkat keras yang digunakan yaitu laptop dengan spesifikasi RAM 8GB, Windows 13 32-bit sebagai sistem operasi. Perangkat lunak yang digunakan adalah PyRx (Vina dan AutoDock)(*chimica et natura octa*, 2016).

Bahan : enzim target adalah elastase dan collagenase, enzim ini dapat diunduh dari www.pdb.org dengan kriteria pemilihan kata Pdb ID elastase (PDB id: 1Y93) dan collagenase (PDB id: 2D1N).

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 In vitro

1. Ekstraksi daun pegagan (*Centella asiatica*)

Tahap ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam simplisia pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 gr dengan etanol 70% 500 ml (1:5) selama 2 x 24 Jam. Setelah 2 x 24 jam rendaman disaring dengan

menggunakan kertas saring kemudian dilakukan penguapan dengan menggunakan *Rorary evaporator*. Jika sudah dihasilkan hasil ekstrak berbentuk pasta, maka ekstrak siap untuk digunakan.

2. Pembuatan Media Stock DMEM

Ditimbang 1,35 gr DMEM, 0,37 gr NaHCO₃, 0,006 gr penicilin, 0,01gr streptomycin dan 0,23 gr hepes. Semua bahan tersebut dilarutkan dengan 100 ml *deionized water* (DI) steril, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan difilter dengan membran millipore 0,22µm. Selanjutnya dimasukkan dalam botol tutup ulir dan disimpan pada suhu 4⁰C. Media stock siap untuk digunakan.

3. Sertifikat kritikal etik

Tikus didislokasi dibedah sesuai dengan standar prosedur dari komisi etik penelitian (KEP) Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dengan nomor sertifikat 029/EC/KEP-FST/2022.

4. Isolasi dan Kultur Sel fibroblast Tikus (*Rattus norvegicus*)(Jana *et al*, 2007)

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan adalah tikus betina yang bunting berumur 18 hari, kemudian dibunuh dengan cara dislokasi leher disemprot alkohol 70% pada bagian abdomen dan dibedah. Uterus dikeluarkan dan dipotong kemudian dicuci dengan larutan PBS steril (*Phosphat buffer saline*), lalu dicuci dengan alkohol 70% sebentar, kemudian dicuci kembali dengan larutan PBS steril. Uterus dibawa ke dalam LAF (*Laminar air flow*), fetus dikeluarkan dari dalam uterus kemudian dilakukan pemotongan pada bagian kepala dan mengeluarkan organ dalam dengan menggunakan gunting dan pinset. Tubuh fetus dicuci dengan 1% anibiotik penstrep (*Penicillin streptomycin*) dalam PBS steril (0,5 ml penstrep didalam 50 ml PBS Steril)

Organ dipindah dan dicacah pada 500 µl tripsin sampai halus, dihomogenasi dengan spuit. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung sentrifus. Sisa homogenasi ditambah 500 µl PBS (1:1) kemudian diinkubasi selama 20 menit.

Tabung sentrifus diambil dari inkubator dan di sentrifus 2500 rpm selama 5 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet ditambahkan dengan 3 ml media DMEM, 3 ml fungizone dan 1 ml penisilin streptomisin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan 3 ml DMEM 10% FBS dan 3 ml fungizone kemudian disentrifus kembali. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 1 ml kemudian dipipeting. Hasil pelet diambil 50 µl kemudian dimasukkan ke dalam multiwell 24 yang telah berisi DMEM 10% FBS dan fungizone. Kemudian sel dikultur pada suhu 37⁰C, 5% CO₂ . Untuk perlakuan dilakukan setelah kultur sel mengalami konfluen.

Jumlah sel yang ditanam adalah sebanyak 7000 sel pada masing-masing well. Menurut Freshney (2000) jumlah sel yang ditanam dalam *multiwell* 24 adalah berkisar antara 2x10² sel/ ml sampai dengan 2x10⁵ sel/ml. Jumlah sel tersebut setara dengan 2000 sampai dengan 200000 sel/ml.

5. Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok pada rancangan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kelompok K : Sel fibroblast dalam media DMEM (2700 µl) + 10% FBS (300 µl) + DMSO 10% selama 72 jam.
2. Kelompok P1 : Sel fbroblast dalam media DMEM (2370 µl) + 10% FBS (300 µl) dengan pemberian ekstrak pegagan 10 % selama 72 jam.
3. Kelompok P2 : Sel Fibroblast dalam media DMEM (2280 µl) + 10% FBS (300 µl) dengan pemberian ekstrak pegagan 15% selama 72 jam.

4. Kelompok P3 : Sel fibroblast dalam media DMEM (2190 μ l) + 10% FBS (300 μ l) dengan pemberian ekstrak pegagan 20 % selama 72 jam.
5. Kelompok P4 : Sel fibroblast dalam media DMEM (2100 μ l) + 10% FBS (300 μ l) dengan pemberian ekstrak pegagan 25% selama 72 jam.

6. Pengamatan Konfluenitas Sel Fibroblast Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengamatan konfluenitas sel fibroblast dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan sel fibroblast pada perlakuan yang berbeda. Konfluenitas sel fibroblast diamati berdasarkan tingkat perlekatan sel dengan substrat dan ekspansi sel dengan menggunakan *Mikroskop Inverted* dan dianalisis menggunakan program *ImageJ*.

Apabila sel telah konfluen maka dapat dilakukan pasase dengan cara media dibuang, kemudian dicuci dengan 1 ml PBS, fungizone dan penicilin streptomycin. Sel dicuci dengan media DMEM, fungizone, penicilin streptomycin kemudian diberi tripsin EDTA 200 μ l. Setelah itu dikocok pelan dan dibagi tripsinasi menjadi 2 dan dimasukkan dalam multiwell 24 baru yang telah berisi media DMEM dengan 10% FBS, fungizone, kemudian diinduksi ekstrak *Centella asiatica* dengan konsentrasi 0,1 μ g/ ml untuk perlakuan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Setelah 2x24 jam media diganti dengan DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak daun pegagan sesuai dengan perlakuan (Fakultas Farmasi Unair, 2013).

7. Pengamatan Viabilitas Sel fibroblast Tikus (*Rattus norvegicus*)

Perhitungan viabilitas sel fibroblast dilakukan untuk mengetahui persentase perbandingan antara sel hidup dan sel yang mati. Perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan *Countess™ II FL automated cell counter*. Adapun prosedur pengamatan viabilitas sel disesuaikan dengan *Countess™ II FL automated cell counter User Guide* (2019). Sebanyak 10 μ l *tripan blue* 0,4% ditambahkan pada 10 μ l

suspensi sel, kemudian dicampurkan dengan baik. Diambil 10 µl campuran sampel dan dimasukkan ke dalam ruang pada slide, campuran didiamkan selama 30 detik. Campuran sampel kemudian dimasukkan pada *port* slide di instrumen. Instrumen akan membaca secara otomatis, mengatur fokus dan intensitas cahaya, kemudian akan menunjukkan jumlah konsentrasi sel, persentase sel yang hidup dan yang mati.

3.5.2 In silico

1. Screening senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Centella asiatica*.

Langkah-langkah screening senyawa adalah:

1. Screening senyawa secara instrumen

Screening ini dilakukan untuk menentukan senyawa yang akan digunakan dalam screening menggunakan software PASSOnline. Kriteria screening instrumen adalah nilai prosentase area senyawa diatas 2 %.

2. Screening senyawa menggunakan software PASSOnline

Screening ini dilakukan untuk mengetahui senyawa yang berpotensi sebagai antiaging. Untuk mengetahui senyawa tersebut berpotensi sebagai antiaging dilihat nilai Pa (prediksi senyawa aktif), Pi (prediksi senyawa in aktif) dan aktifitas senyawa.

3. Docking molecular

Docking molecular dilakukan untuk mengetahui ikatan senyawa berpotensi sebagai *antiaging* yang terkandung dalam ekstrak *Centella asiatica* dengan enzim *collagenase* dan *elastase*. Untuk mengetahui ikatan senyawa yang berpotensi sebagai *antiaging* yang terkandung dalam ekstrak *Centella asiatica* dengan enzim *collagenase* dan *elastase* dilihat nilai binding affinity (ukuran kemampuan senyawa berikatan dengan reseptor), semakin tinggi nilai negatif maka semakin baik ikatan senyawa dengan enzim. Enzim diunduh dari bank data protein (www.pdb.org) dengan ligan terikat yang

sesuai. Kode pdb adalah elastase (PDB id: 1Y93), collagenase (PDB id: 2D1N).
dengan server PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>).

3.6 Analisis Data

3.6.1 Analisis data In vitro

Analisis data dilakukan setelah hasil penelitian terkumpul semua. Analisis data menggunakan :

1. Program Imagej

Program ini digunakan untuk mengukur tingkat konfluensitas sel.

2. Automatic Cell Counter

Alat ini digunakan untuk menghitung tingkat viabilitas sel

3. Uji Distribusi Normal

Uji ini dilakukan untuk mengetahui distribusi atau sebaran data apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak pada masing-masing variabel dan masing-masing kelompok.

4. Uji Homogenitas

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak, sebagai persyaratan untuk uji berikutnya.

5. Uji One Way Anova dengan taraf signifikansi 0,05

Uji ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing variabel, apabila dari analisis varian didapatkan pengaruh perlakuan pada variabel dependen, maka dilanjutkan uji lanjut Duncan untuk mengetahui perbedaan perlakuan pada masing-masing kelompok.

3.6.2 Analisis data In silico

Data yang didapat dianalisis menggunakan :

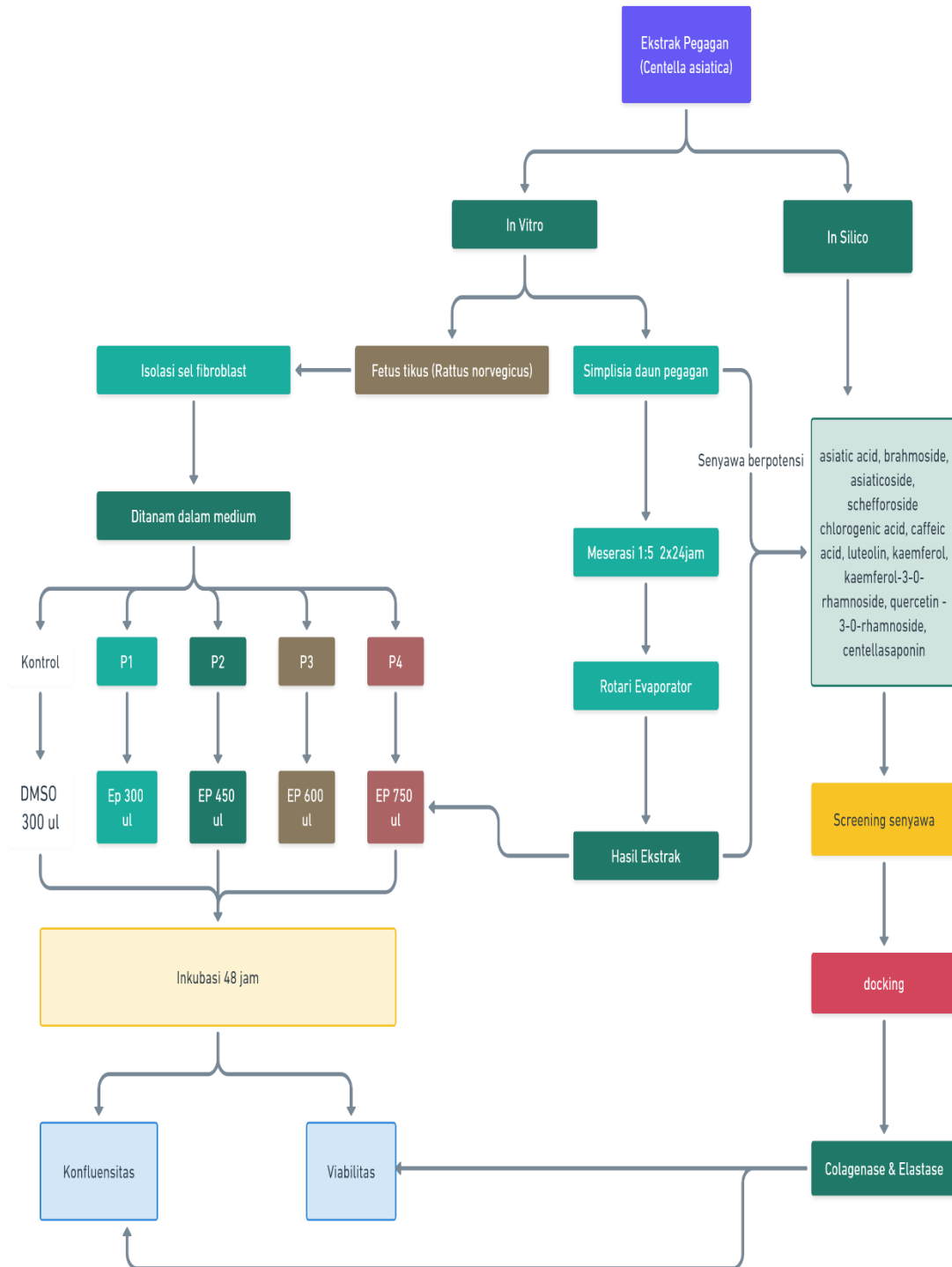
1. Analisis kuantitatif

Analisis ini digunakan untuk mengetahui nilai senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Centella asiatica* dengan prosentase area diatas 3%, nilai Pa (prediksi nilai senyawa aktif) dan nilai binding afinity (ukuran kemampuan senyawa berikatan dengan reseptor).

2. Analisis deskriptif

Analisis ini digunakan untuk menggambarkan ikatan senyawa yang berpotensi sebagai antiaging dengan enzim dan protein target. Ikatan senyawa dengan enzim dan protein target ditampilkan dengan menggunakan PyMOL dan PLIP untuk melihat residu yang terlibat.

3.7 Alur penelitian



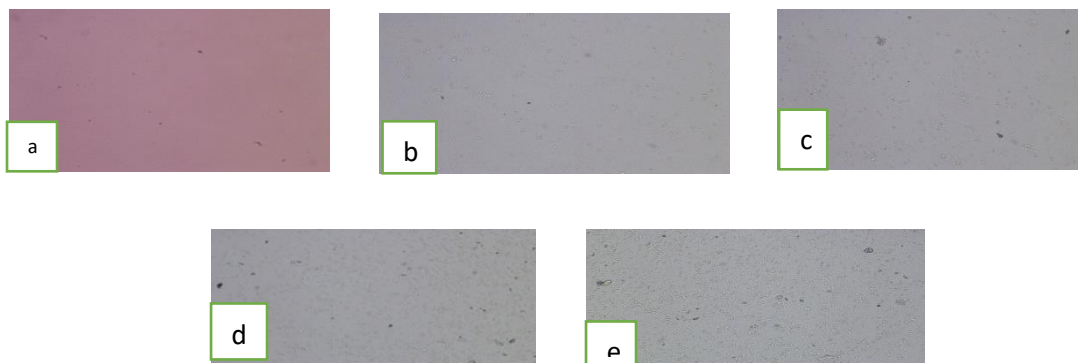
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji potensi antiaging ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap proliferasi sel fibroblast fetus tikus.

4.1.1 Hasil uji konfluensitas sel fibroblast fetus tikus (*Rattus norvegicus*)

Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan konfluensitas sel sebelum dan sesudah pemberian ekstrak *Centella asiatica*, ditunjukkan gambar 4.1



Gambar 4.1 : A. perlakuan kontrol, B.Perlakuan 10% C.Perlakuan 15% D.Perlakuan 20% E.Perlakuan 25%

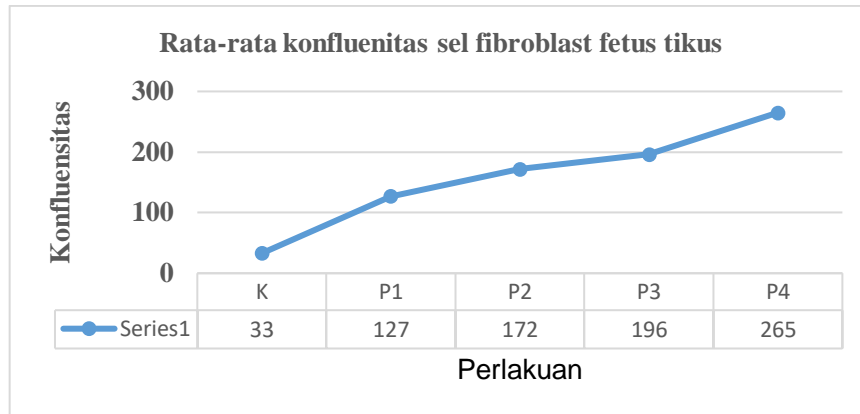
Dari gambar diatas menunjukkan konfluensitas sel fibroblast fetus tikus sebelum pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dan sesudah pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) hasilnya berbeda, gambar b,c,d,e konfluensitasnya lebih banyak dibanding dengan gambar a, hal ini dikarenakan proliferasi sel pada gambar b,c,d,e lebih baik hampir menutupi semua cawan petri.

Pertumbuhan sel dalam kultur terbagi menjadi tiga fase yaitu : lag fase, log fase dan dan plateau fase (Djuwita, 2002). Lag fase merupakan periode perlekatan dan penyebaran sel pada substrat karena sel mengalami proses adaptasi. Pada fase ini belum terjadi peningkatan jumlah sel (Butler, 2004). Log fase merupakan periode peningkatan jumlah sel secara eksponensial pada saat pertumbuhan. Plateau fase

ditandai dengan kultur menjadi konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan lingkungan. Pada fase ini pertumbuhan sel akan menurun hingga mencapai 10% (Djuwita, 2002).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel adalah nutrisi yang terdapat pada media kultur dan pemilihan sel yang dikultur. Nutrisi yang terkandung dalam media kultur terdiri dari karbohidrat, vitamin, asam amino, hormon, mineral dan beberapa unsur yang lain (Butler, 2004). Kultur sel primer cenderung menunjukkan kemiripan morfologi dengan jaringan induk dan mampu mempertahankan beberapa keragaman. Setelah proses penanaman, sel-sel yang mampu berproliferasi akan mengalami penambahan jumlah, akan tetapi beberapa jenis sel hanya mampu bertahan, tetapi tidak mengalami proliferasi, bahkan ada yang tidak dapat bertahan dalam kondisi tertentu. Oleh karena itu, proporsi kebutuhan setiap sel relatif diperlukan sampai sel tersebut dalam kondisi monolayer (Freshney, 2010).

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan yang berbeda yaitu kontrol (tanpa pemberian ekstrak *Centella asiatica*), P1: 10%, P2 :15 %, P3 : 20%, dan P4 : 25%. Pada hari ke-3 setelah penanaman, sel fibroblast fetus tikus (*Rattus norvegicus*) telah mengalami konfluenitas sekitar 50%, hasil tersebut menunjukkan bahwa sel telah mengalami pertumbuhan pada tahap *log phase* (fase eksponensial) yaitu fase sel yang mengalami peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen. Dari masing-masing pemberian konsentrasi menunjukkan konfluenitas yang berbeda, ditunjukkan oleh gambar 4.2.



Gambar 4.2 : Rata-rata konfluenitas sel fibroblast fetus tikus pada masing-masing perlakuan

Data konfluenitas sel fibroblast selanjutnya dilakukan uji *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Shapiro-Wilk Test* menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$) pada kelompok K, P1, P2, P3, P4 (Lampiran 1). Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data tersebut homogen ($P > 0,05$) pada kelompok K, P1, P2, P3 dan P4 (Lampiran 1). Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa konfluenitas sel fibroblast menunjukkan adanya pengaruh nyata antara kontrol dan perlakuan. Untuk mengetahui pengaruh pada 5 perlakuan dan masing-masing 4 ulangan dapat dilanjutkan dengan uji Duncan, ditunjukkan tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil analisis uji lanjut ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap konfluensitas sel fibroblast fetus tikus

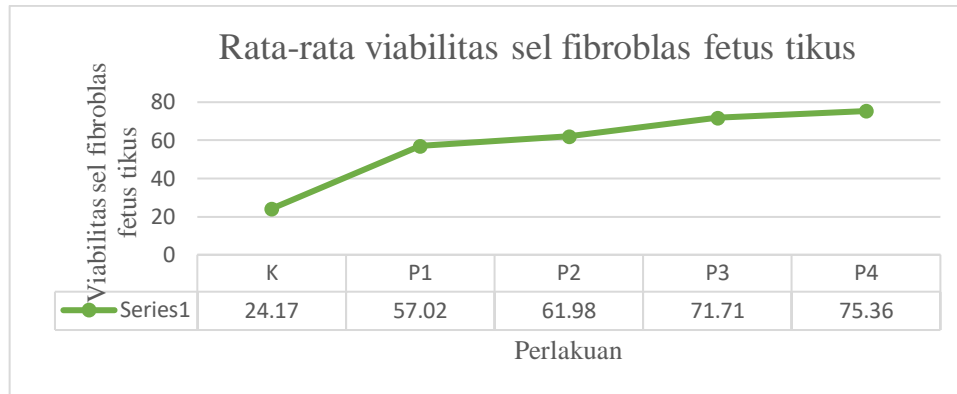
Perlakuan	Rata-rata konfluensitas/mm
K (0%)	33
P1 (10%)	129
P2 (15%)	172
P3 (20%)	196
P4 (25%)	265

Dari tabel di atas menunjukkan ada perbedaan pada masing-masing perlakuan, perlakuan kontrol menunjukkan konfluensitas terendah dibandingkan P1, P2, P3, dan P4. Nilai konfluensitas sel fibroblast tertinggi pada perlakuan P4 (25%) dengan rata-rata 265, sedangkan pada perlakuan P3 lebih tinggi dibandingkan P2 dan P1. Hal ini menunjukkan antioksidan yang terkandung pada ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mampu menetralkan paparan ROS yang terjadi secara terus menerus, sehingga memicu peningkatan konfluensitas sel fibroblast. Peningkatan konfluensitas sel fibroblast dapat mempengaruhi transkripsi MMP dengan menekan aktivasi AP-1 secara bersamaan mengembalikan reduksi induksi radikal bebas pada prokolagen tipe-1 dan ekspresi TGF- β 1 dengan mengatur smads, Sehingga mengurangi tanda-tanda penuaan (photoaging) hilang (Eunson Hwang *et al*, 2017).

4.1.2 Hasil uji viabilitas sel fibroblas fetus tikus (*Rattus norvegicus*)

Viabilitas merupakan salah satu parameter penting yang menunjukkan kemampuan sel untuk bertahan hidup dan menjelaskan proses metabolisme sel dalam media selama proses kultur in vitro berlangsung (Bolt, 2001). Browne dan Al-Rubei (2011) mengatakan dalam kultur sel, viabilitas yang optimal sangat penting dalam menjaga kualitas sel dan dapat mempengaruhi keberhasilan kultur. Sedangkan sel yang non-viable (mati) dalam kultur dapat menghambat produktivitas sel dalam perkembangannya.

Hasil analisis viabilitas sel fibroblast antara kontrol dan perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda, hal ini ditunjukkan gambar 4.3.



Gambar 4.3 Rata-rata viabilitas sel fibroblast fetus tikus pada masing-masing perlakuan

Data viabilitas sel fibroblast selanjutnya dilakukan uji *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Shapiro-Wilk Test* menunjukkan data berdistribusi normal ($P > 0,05$) pada kelompok K, P1, P2, P3, P4 (Lampiran 2). Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data tersebut homogen ($P > 0,05$) pada kelompok K, P1, P2, P3 dan P4 (Lampiran 2). Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa viabilitas sel fibroblast menunjukkan adanya pengaruh nyata antara kontrol dan perlakuan. Untuk mengetahui pengaruh pada 5 perlakuan dan masing-masing 4 ulangan dapat dilanjutkan dengan uji Duncan, ditunjukkan tabel 4.2.

Tabel 4.2 Ringkasan Pengaruh ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap viabilitas Sel fibroblast fetus Tikus

Perlakuan	% Viabilitas ± SD
K	24,17 ± 6,02
P1 = 10%	57,02 ± 6,59
P2 = 15%	61,98 ± 6,60
P3 = 20%	71,71 ± 10,52
P4 = 25%	75,36 ± 15,94

Ket : Angka yang didampingi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada masing-masing perlakuan dengan taraf signifikansi ($\alpha = 0.05$)

Berdasarkan tabel ringkasan UJD 5% tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap viabilitas sel fibroblast pada perlakuan Kontrol (K) berbeda nyata dengan perlakuan P1, P2, P3 dan P4. Perlakuan P4 mengalami peningkatan viabilitas sel fibroblast tertinggi dengan nilai rata-rata 75,36 %, sedangkan nilai viabilitas terendah pada perlakuan kontrol dengan nilai rata-rata 24,17 %. Hal ini menunjukkan antioksidan yang terkandung pada ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mampu menetralkan paparan ROS yang terjadi secara terus menerus, sehingga memicu peningkatan viabilitas sel fibroblast. Peningkatan viabilitas sel fibroblast dapat mempengaruhi transkripsi MMP dengan menekan aktivasi AP-1 secara bersamaan mengembalikan reduksi induksi radikal bebas pada prokolagen tipe-1 dan ekspresi TGF- β 1 dengan mengatur smads, Sehingga mengurangi tanda-tanda penuaan (photoaging) hilang (Eunson Hwang *et al*, 2017).

Viabilitas sel merupakan ukuran yang digunakan dalam menentukan kemampuan sel untuk hidup dalam suatu populasi (Butler, 2004). Penentuan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan (Mothersill *and* Austin, 2003). Pada sel epitel, penentuan viabilitas menggunakan *trypan blue* (Grajek *and* Olejnik, 2004). Pewarnaan dengan *trypan blue*, sel yang hidup ditandai dengan warna bening dan sel yang mati berwarna biru (Butler, 2004). Media kultur berperan penting dalam mempertahankan kelangsungan hidupsel. Media kultur optimal dapat mempertahankan kelangsungan hidup sel dengan viabilitas minimal sebesar 95% (Gibco, 2011).

Secara fisiologis, pertumbuhan sel dalam individu diatur oleh sistem keseimbangan yaitu apoptosis dan proliferasi. Apabila terjadi opoptosis berlebih dalam sel maka akan mengalami penurunan fungsi dalam sistem organ. Penurunan

fungsi pada sistem organ memicu berbagai macam penyakit termasuk penuaan (photoaging) pada kulit (Sudiana, 2008). Proses pertumbuhan sel membutuhkan keseimbangan, baik proliferasi maupun apoptosis. Jika keduanya bekerja tidak seimbang akan mempengaruhi pada siklus sel, hal ini sesuai dengan firman Allah pada surat Al-Mulk ayat 3 yang berbunyi :

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِنْ تَفْوُتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَى مِنْ فُتُورٍ

Artinya : (Dia juga) yang menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu tidak akan melihat pada ciptaan Tuhan Yang Maha Pengasih ketidakseimbangan sedikit pun. Maka, lihatlah sekali lagi! Adakah kamu melihat suatu cela? (Q.S Al-Mulk:3)

Maksud مَا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِنْ تَفْوُتٍ bersesuaian dan seimbang. Tidak ada pertentangan, benturan, ketidakcocokan, kekurangan dan kerusakan (Abdullah, 2006). Shihab (2003) menjelaskan bahwa Allah menciptakan seluruh makhluk dalam keadaan seimbang sebagai rahmat, karena seandainya ciptaan-Nya tidak seimbang, maka tentulah akan terjadi kekacauan.

Kata seimbang pada firman Allah diatas dapat diartikan sebagai keadaan yang homeostatis. Seperti halnya proses keseimbangan dalam proses pertumbuhan sel. Apabila proses proliferasi dan apoptosis berjalan tidak seimbang maka akan berdampak buruk bagi kelangsungan hidup suatu organisme.

4.2 Screening senyawa yang berpotensi sebagai antiaging dalam ekstrak





Centella asiatica

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian in vitro berupa crude ekstrak (ekstrak kasar) sehingga tidak diketahui senyawa mana yang berpotensi sebagai anti aging. Oleh karena itu pendekatan in silico dibutuhkan untuk screening senyawa yang berpotensi sebagai anti aging.

Screening senyawa yang berpotensi sebagai antiaging dengan instrumen nilai prosentase area diatas 2% diperoleh hasil sejumlah 19 senyawa, ditunjukkan tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil screening senyawa secara intrumen nilai prosentase area diatas 2%.

No	Nama Senyawa	Prosentase area	Struktur kimia
1	p-coumaric acid	2,73683	C ₉ H ₈ O ₃
2	Caffeic acid	3,68297	C ₉ H ₈ O ₄
3	Ferulic acid	3,06581	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
4	Luteolin	4,69566	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
5	Kaempferol	4,08474	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
6	Quercetin	2,94681	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
7	Chlorogenic acid	5,27953	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
8	Kaempferol-3-arabinoside	3,30663	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀
9	Kaempferol-7 rhamnoside	2,41398	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
10	Kaempferol-4'- rhamnoside	3,08793	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
11	Kaempferol-3-O-rhamnoside	4,07410	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
12	Quercetin-3- arabinoside	2,04594	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁
13	Quercetin-3-O-rhamnoside	3,73710	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
14	Kaempferol-3-O-glucoside	2,48447	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
15	Asiatic acid	5,82484	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
16	Centellasapogenol A	2,51351	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
17	Methyl asiataate	2,81238	C ₃₁ H ₅₀ O ₅
18	Brahmoside	2,19347	C ₃₀ H ₄₈ O ₆
19	Rutin	3,37806	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆

Ket :  : Asam Klorogenat  : Flavanoid  : Saponin  :Triterpenoid

Farhaty (2012) mengatakan senyawa golongan asam klorogenat merupakan senyawa fenolik yang bermanfaat bagi tumbuhan dan manusia. Senyawa ini digunakan tumbuhan sebagai pelindung dari serangan mikroorganisme, serangga dan juga radiasi UV. Pada manusia golongan senyawa asam klorogenat bermanfaat sebagai antioksidan dan antivirus. Sebagai antioksidan senyawa asam klorogenat dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah terjadinya penuaan (Photoaging). Sebagai antivirus asam klorogenat mampu menghambat replikasi virus yang menyebabkan kekebalan tubuh menurun (Murry *et al*, 2003). Golongan senyawa flavonoid merupakan senyawa yang mempunyai manfaat bagi kesehatan tubuh termasuk anti penuaan, antioksidan, anti-inflamasi,

kardioprotektif, anti-diabetes, anti kanker, anti virus (Arifin, 2018).

Dari 19 senyawa dilanjutkan screening menggunakan software PASSOnline dengan tujuan untuk mengetahui aktifitas senyawa dan prediksi nilai senyawa aktif (Pa) dan prediksi senyawa in aktif, ditunjukkan tabel 4.6

Tabel 4.4 Hasil screening senyawa menggunakan Software PASSOnline

N O	Nama Senyawa	Kode Senyawa	Aktifitas senyawa (PASSOnline)	Prediksi nilai senyawa aktif (Pa)	Prediksi nilai senyawa inaktif (Pi)
1	p-coumaric acid	637542	flavaniod biosynthetic	0,641	0,024
2	p-coumaric acid A	637542	Respon to UV B	0,641	0,024
3	Luteolin	5280445	Flavone and flavanol biosynthesis	0,775	0,004
4	Kaempferol	5280863	Flavanoid biosynthesis process	0,856	0,003
5	Quercetin-3-arabinoside	12309865	Antioxidant	0,922	0,003
6	Quercetin-3-O rhamnoside	5353915	Antioxidant	0,915	0,003
7	Asiatic acid	119034	Antiinflammatory	0,399	0,012
8	Centellasapogenol A	73196815	Antiinflammatory	0,873	0,005
9	Methyl asiatae	21672634	Antiinflammatory	0,901	0,004
10	Caffeic acid	689043	Catechol oxidase inhibitor	0,912	0,002
11	Ferulic acid	445858	Antimutagenic	0,900	0,002
12	Chologenic acid	1794427	Anticarcinogenic	0,846	0,004
13	Kaempferol-3-O-glucoside	5282102	Anticarcinogenic	0,953	0,001
14	Brahmoside	395762			
15	Rutin	5280805	Cardioprotectant	0,988	0,001
16	Quercetin	5280343	antioxidant	0,872	0,003
17	Kaempferol-7 rhamnoside	25079965	Anticarcinogenic	0,929	0,002
18	Kaempferol-4'-rhamnoside	44258925	Anticarcinogenic	0,929	0,002
19	Kaempferol-3-O-rhamnoside	5835713	Cardioprotectant	0,974	0,001

Ket : : senyawa yg berpotensi antiaging

Dari tabel diatas menunjukkan hasil screening menggunakan software PASSOnline didapat 8 (delapan) senyawa yang aktifitas senyawa dan prediksi nilai senyawa aktif (Pa) dan prediksi senyawa inaktif (Pi) berpotensi sebagai antiaging. Pedoman dalam menentukan senyawa berpotensi sebagai antiaging dilihat prediksi nilai senyawa aktifnya (Pa), jika nilai Pa semakin tinggi maka potensi antiaging semakin kuat (baik), sebaliknya jika prediksi nilai senyawa aktifnya (Pa) semakin rendah maka potensi antiaging semakin lemah (buruk). Dari 8 (delapan) senyawa tersebut prediksi nilai senyawa aktifnya (Pa) paling tinggi adalah senyawa Quercetin-3- arabinoside : 0,922 prediksi nilai senyawa inaktif (Pi) : 0,003, Quercetin-3-O rhamnoside : 0,915 prediksi nilai senyawa inaktif (Pi) : 0,003 dan Methyl asiatate : 0,901 prediksi nilai senyawa inaktif (Pi) 0,004. Hal ini menunjukkan senyawa tersebut potensi antiagingnya sangat kuat (baik). Sedangkan senyawa p-coumaric acid A, p-coumaric acid, Luteolin, Kaempferol, Asiatic acid dan Centellasapogenol A juga berpotensi sebagai antiaging tetapi tidak sekuat senyawa Quercetin-3- arabinoside, Quercetin-3-O rhamnoside dan Methyl asiatate.

4.3 Ikatan senyawa (ligan) aktif dengan enzim collagenase, elastase (reseptor) dan referensi inhibitor (kojic acid dan quercetin) .

Docking molekuler merupakan langkah yang digunakan untuk mengetahui ikatan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dengan enzim collagenase dan elastase. Hasil docking molekuler terhadap enzim collagenase dan elastase dengan referensi inhibitor (enzim penghambat) quercetin dan kojic acid, ditunjukkan tabel 4.5.

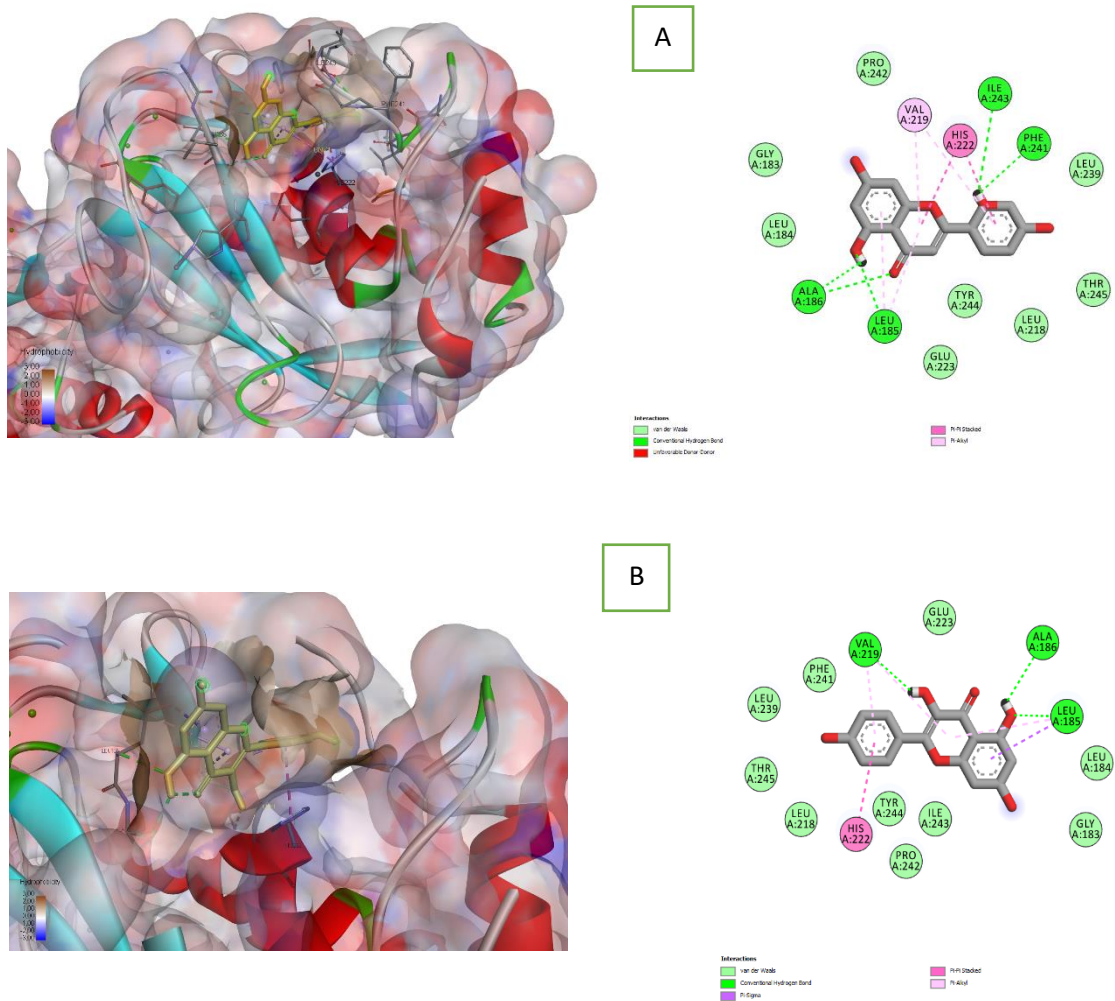
Tabel 4.5 Nilai binding affinity senyawa metabolit sekunder *Centella asiatica* terhadap enzim collagenase dan elastase .

No	Senyawa	ΔG	Interaksi dengan collagenase	
			Vander waals	Convensional Hydrogen bond
1	Quercetin	-9,2	LEU A: 184, GLY A: 183, GLU A: 223, PHE A: 241, ALA A: 238, LEU A: 239, THR A: 245, LEU A: 218, ILE A: 243, TYR A: 244, PRO A : 242.	LEU A:185,ALA A: 186, VAL A: 219.
2	p-coumaric acid A	-6.9	ILE A: 243, THR A: 245, LEU A: 239, HIS A: 222, GLU A: 223, LEU A: 184	LEUA:218, ALA:186
3	Luteolin	-9.9	GLUA : 223, TYR A: 244, LEU A: 218, THR A: 245, LEU A : 239, PRO A: 242, GLY A: 183, LEU A : 184.	ILE A: 243, PHE A: 241, ALA A: 186, LEU A: 185
4	Kaemferol	-9.1	TYR A: 244, PRO A: 242, ILE A: 243, GLY A: 183, LEU A: 184, GLU A: 223, PHE A: 241, LEU A: 239, THR A: 245, LEU A:218	VAL A: 219, ALA A: 186, LEU A: 185.
5	Quercetin-3-arabinoside	-8.9	ILE A: 243, PHE A: 241, THR A: 245, TYR A: 244, VAL A: 219, ZN A: 270, ALA A: 186, GLU A: 223, HIS A: 187, HIS A: 226.	ALA A: 188, TYR A: 176, GLY A: 183, PRO A: 242
6	Quercetin-3-Orhamnoside	-8.8	-	ILE A: 243, PRO A: 242, ALA A: 188.
7	Asiatic acid	-7.9	TYR B : 176, HIS B : 232, LEU B : 184, PRO B : 242, ILE B : 243, LEU B : 185, ZN B : 280, HIS B : 226, ALA B : 186, HIS B : 187, ASP B : 231, PRO B : 190, PHE B : 189, PHE B : 107, PRO B: 108	ALA B : 188.
8	Centellasapogenol A	-7.7	GLY A : 183, ILE A: 243, TYRA A: 244, LEU A : 184, TYR A: 176, ZN A: 222, PRO A: 190, PHE A: 107, HIS A: 226	PRO A : 242, LEU A : 185, ALA A : 186, ASP A: 231
9	Methyl asiatate	-7.0	PHE A : 189, PRO A: 190, ZN A: 270, HIS A: 226, HIS A : 187, HIS A: 232, LEU A: 184, TYR A: 176.	ALA A: 186

No	Senyawa	ΔG	Interaksi dengan elastase	
			Vander waals	Convensional Hydrogen bond
1	Cojic acid	-5,2	THR A: 239, ALA A: 234, VAL A: 243, PHE A: 248, THR A: 215, TYR A: 240	PRO A: 238, PHE A: 237
2	p-coumaric acid A	-7.4	ILE A : 180, PHE A: 237, LYS A : 241, ALA A : 234, LEU A : 214, TYR A : 240, THR A : 215, PRO A : 238	-
3	Luteolin	-9.6	THR A : 215, TYR A : 240, PRO A : 232, LYS A: 233, PHE A : 248, ARG A:249, PRO A: 238	HIS A: 218, PHE A: 237, THR A: 239
4	Kaempferol	-9.4	-	THR A : 239
5	Quercetin-3-arabinoside	-7.3	HIS A : 218, TYR A : 240, THR A : 239, ILE A : 180	ALA A : 184, HIS A: 222, PRO A : 238, ALA A : 182, LEU A : 181,
6	Quercetin-3-Orhamnoside	-7.9	ALA A: 173, ALA A: 182, Pi ALKYL : ILE A : 180,	PHE A : 185, HIS A : 228, PRO A : 238, HIS A : 218, ZN A : 264, HIS A: 222, GLU A : 219, HIS A: 183, ASP A : 175, PHE A: 174,
7	Asiatic acid	-7.3	GLY A: 106, PRO A: 107, PHE A: 185, ALA A: 184, HIS A: 172, HIS A: 183, ILE A: 180, HIS A: 228, GLY A : 186, HIS A : 222, LEU A: 226, GLY A: 227, GLY A: 225	-
8	Centellasapogenol A	-6.8	-	HIS A : 222, GLY A : 186
9	Methyl asiatate	-7.2	ILE A : 180, ZN A : 264, HIS A : 218, HIS A : 172, ALA A: 173	HIS A : 222, ALA A: 184

Tabel diatas menunjukkan bahwa ikatan senyawa yang paling kuat terhadap enzim collagenase dan elastase adalah senyawa luteolin -9,9 kkal/mol, yang melebihi referensi inhibitor (enzim penghambat) quercetin dengan skor -9,2 kkal/mol. Senyawa yang lain seperti p-coumaric acid A , Quercetin-3- arabinoside, Quercetin-3-Orhamnoside, Asiatic acid, Centellasapogenol A, Methyl asiatate menunjukkan skor kisaran -8,9 hingga -6,9 kkal/mol, lebih rendah dari quercetin. Dari Sembilan senyawa hasil docking yang paling kuat ikatannya dengan enzim collagenase adalah senyawa Quercetin, ditunjukkan gambar 4.4. Semakin negatif nilai binding afinity (Kemampuan senyawa untuk berikatan dengan

reseptor) maka afinitas antara reseptor dan ligan semakin tinggi, begitu juga sebaliknya (Saputri dkk, 2016).



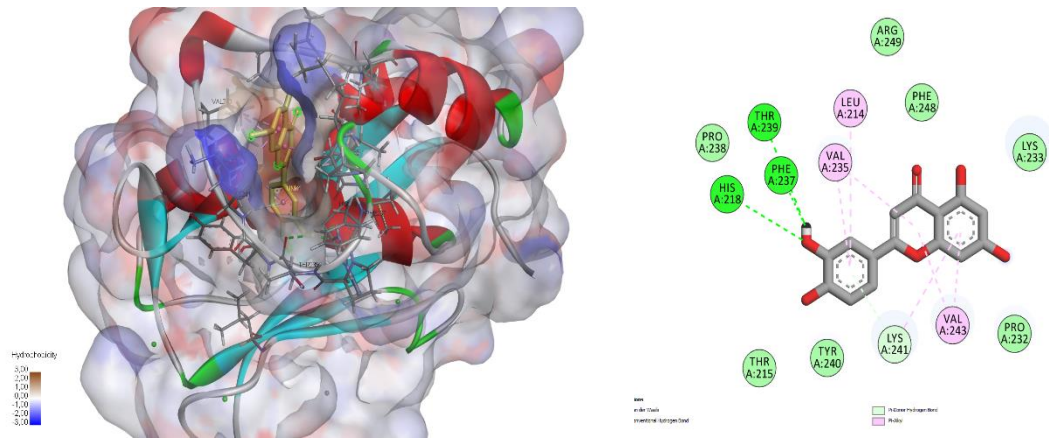
**Gambar 4.4 : a.Ikatan senyawa luteolin berikatan dengan enzim Collagenase
b.Ikatan senyawa kaempferol berikatan dengan enzim Collagenase**

Gambar diatas menunjukkan bahwa senyawa luteolin dan kaempferol mampu berikatan kuat dengan enzim Collagenase. Hal ini menunjukkan senyawa luteolin dan kaempferol mampu mendegradasi lebih baik dari pada quercetin, sehingga bisa mempengaruhi konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast. Peningkatan proliferasi sel fibroblast

mengakibatkan produksi collagen didalam tubuh meningkat. Adanya kestabilan collagen dalam tubuh menyebabkan kulit menjadi kenyal.

Enzim elastase berikatan sangat kuat dengan senyawa luteolin dengan skor docking -9,6 dan -9,4 kkal/mol dibandingkan dengan enzim referensi inhibitor kojic acid -5,2 kkal/mol. Senyawa lain seperti p-coumaric acid A, Quercetin-3- arabinoside, Quercetin-3-Orhamnoside, Asiatic acid, Centellasapogenol A dan Methyl asiatate juga berikatan sangat kuat dengan enzim elastase kisaran skor docking -7,9 sampai -7,2 kkal/mol tetapi senyawa tersebut tidak sekuat senyawa luteolin, ditunjukkan **gambar 4.5**.

Sel fibroblast merupakan sel yang menghasilkan kolagen (70-80%) untuk kekenyalan, elastin (1-3%) untuk elastisitas, dan proteoglikan untuk kelembaban. Sel fibroblast juga menghasilkan enzim collagenase dan stromelysin. Sel imun seperti sel mast, polimorfonuklear leukosit, limfosit, dan makrofag terdapat pada lapisan dermis (Khazanchi, 2007; Scott and Bennion, 2011). Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) mampu mencegah terjadinya penuaan (aging). Proses penuaan terjadi karena adanya radikal bebas baik secara intrinsik dan ekstrinsik. Radikal bebas bisa dinetralkan dengan pemberian antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dibutuhkan tubuh untuk menentralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan terhadap sel normal, protein dan lemak, hal ini dibuktikan dengan peningkatan konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast. Peningkatan konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast dapat memicu produksi kolagen dan elastin, sehingga kulit tampak kenyal dan elastis.



Gambar 4.5 Ikatan senyawa luteolin dengan enzim elastase

Gambar diatas menunjukkan bahwa senyawa luteolin mampu berikatan sangat kuat dengan enzim Elastase. Hal ini menunjukkan senyawa luteolin mampu mendegradasi lebih baik dari pada cojic acid. Dengan ini senyawa luteolin mampu mempertahankan elastisitas kulit.

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian bisa ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak *Centella asiatica* berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas kultur sel fibroblast
2. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang berpotensi antiaging melalui uji in silico adalah senyawa luteolin dan kaemferol.

5.2 Saran

1. Pada uji in vitro untuk mengetahui potensi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) sebagai anti penuaan (anti aging) dengan hewan model fetus tikus parameter harus ditambah selain konfluenitas dan viabilitas sel fibroblast, uji *collagenase* dan *elastase* harus dilakukan supaya hasilnya maksimal.
2. Pengamatan sel fibroblast sebelum kultur dan sesudah kultur harus tetap dilakukan, dengan tujuan untuk membandingkan konfluenitas dan viabilitas sel sebelum dan sesudah perlakuan.

Daftar Pustaka

- Abdullah, Bin Muhammad, 2006. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 8*. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Al Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Penerjemah: Muhyiddin Mas Rida, Muhammad Rana Mengala. Jakarta: Pustaka Azzam
- Murry *et al*, 2003. Menangkal radikal bebas dengan anti oksidan. Jurnal sanitek Vol II No.2 183-187, Desember 2010, ISSN 2085-8019
- Adnyani, N.M.R.D., Parwata, I.M.O.A., dan Negara, I.M.S., 2016, Potensi Ekstrak Daun Nangka (*Artocarpus Heterophyllus Lam*) Sebagai Antioksidan Alami, 10 (2), 162-167
- Hebbar, Srinis, 2019. Rp-HPLC Method Development and Validasi of Asiatic Acid Isolated from The plant *Centella asiatica*. Int J App Pharm. Vol 11 Issue 3.
- Muchtaromah, Bayyinatul and Umami, Leny Rusvita (2016) *Efek farmakologi pegagan (Centella asiatica(L.) Urban) sebagai suplemen pemacu daya ingat*. Presented at Seminar Nasional Biologi “ from Basic Science to Comprehensive Education”, 26 Aug 2016, Makassar
- Ni Made Ista Prestiyanti, I Putu Gede Adiatmika, I Made Muliarta (2021). Pemberian pasta ekstrak daun pegagan 10% lebih meningkatkan jumlah sel fibroblast dan reepitelisasi pada soket mandibula daripada pasta ekstrak daun mengkudu 10% pasca pencabutan gigi marmut jantan. Intisari Sains Medis 2021, Volume 12, Number 3: 718-723 P-ISSN: 2503-3638, E-ISSN: 2089-9084
- Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic tehniqe*. 5th ed. Willeyand Son, Inc; 2005
- Rahmawati, Hikmah Is'Ada. 2013. Pengaruh Good Corporate Governance (GCG) Terhadap Manajemen Laba Pada Perusahaan Perbankan. Accounting Analysis Journal AAJ 2 (1) (2013). <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/aaaj>
- Setiawan, Didik (2015) Analisa Hidrolik Sistem Lifter Pada Farm Tractor Foton FT 824, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Rosfarizan Mohamad *et al*, 2010. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. Biotechnology and Molecular Biology Reviews Vol. 5(2), pp. 24-37, April 2010 Available online at <http://www.academicjournals.org/BMBR> ISSN 1538-2273 © 2010 Academic Journals
- Ani Haerani, Anis Yohana Chaerunisa, Anas Subarnas, (2017) Antioksidan untuk kulit. Program Studi Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Journal Farmaka Volume 16 Nomor 2

- Jauhar Firdaus¹ *et al*, (2022). Efek Neem gum (*Azadiracthta indica*) terhadap kadar SGOT, SGPT tikus wistar yang diinduksi diazinon. JNC Volume 11, Nomor 3, Tahun 2022, Halaman 258-263 Online di: <http://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jnc/>
- Pangkahila W, (2011). Anti-Aging : Tetap Muda dan Sehat. Jakarta: Penerbit Buku Kompas Gramedia
- Suryohudoyo, (2000). Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta : CV. Infomedika.
- Held, P, (2015). An Intradiction to reactive oxygen species measurement of ROS in yeast cells. *TeachNote*, 1-21. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Sudiana, I.K. (2017). Hantaran sinyal pada proses inflamasi. Surabaya : Airlangga University Press
- Raja sight *et al*, (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* Apr 30;458(7242):1131-5. Doi: 10.1038/nature07976. Epub 2009 Apr
- Power, S.K & Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243-1276. Doi: 10.1152/physrev.00031.2007
- Juwita, Harlystiarini, T. Widyaputri, A. Effendi, E.M Kaiin, Nurhidayat. Tingkat pertumbuhan dan analisa protein sel-sel fibroblas fetal tikus hasil kultur in vitro. Diunduh dari: journal.ipb.ac.id. Home. Vol 1. No 2 (2010)
- Ali Taqwim. 2011 Peran fibroblas pada proses penyembuhan luka. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. <https://dentosca.wordpress.com/2011/04/18/peran-fibroblas-pada-proses-penyembuhan-luka/>
- Junqueira, *et al*. Histologi Dasar Teks dan Atlas. Alih bahasa dr. Jan Tambayong. 2007. Jakarta: EGC.
- Bogor Agricultural University. Tinjauan pustaka sel fibroblas. Diunduh dari : repository.ipb.ac.id.
- Dytha physicaltherapy. Mekanisme Penyembuhan luka. [online] <http://dythaphysicaltherapy.blogspot.com/p/normal-0-false-false-false-en-us-x-none.html>. Diakses tanggal 5 Desember 2014
- Efendi A. 2009. Pengaruh Conditioned Medium Rat Embryonic Fibroblast (CM-REF) Dengan dan Tanpa Leukimia Inhibitory Factor (LIF) dalam Medium terhadap Tingkat Proliferasi dan Sifat Pluripotensi Mesenchymal Stem Cell Sumsum

Tulang Tikus dalam Kultur In Vitro [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Eurell JAC, Sickle DCV. 1998. Connective and Supportive Tissues. Di dalam Dellmann HD dan Eurell JAC, editor. Textbook of Veterinary Histology 5th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Freshney RI. 2000. Introduction to Basic Principles. Di dalam Masters JRW, editor. Animal cell culture: a practical approach. New York: Oxford University Press.

Freshney RI. 2005. Culture of Animal Cells a Manual Basic Technique 5th ed. New York: Wiley-liss, a John Wiley & Sons, Inc, Pub.

Ham RG, McKeehan WL. 1979. Cell Culture. Jakoby WB dan Pastan IH, editor. San Diego: Academic Press, Inc.

Tama, Guruh Putra. 2015. Antioksidan Senjata Paling Ampuh Tangkis Penuaan Dini. <http://www.arrohmah.co.id> (diakses 10 Agustus 2016).