

616.84
HAD

P
2005 e.1

**PENGARUH SINAR ULTRAVIOLET B, DAN HORMON
GENOTROPIN® PADA BIAKAN FIBROBLAS JARINGAN
KULIT MANUSIA, KAJIAN DENGAN AGYROPHILIC NUCLEOLAR
ORGANIZER REGION DAN FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE**

**KHOIRUL HADI
NIM: G3J001089**

**LAPORAN PENELITIAN KARYA AKHIR
PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN KULIT DAN KELAMIN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO**



**BAGIAN / SMF ILMU KESEHATAN KULIT DAN KELAMIN FAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
RS Dr KARIADI SEMARANG**

2005

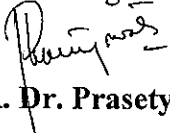
i

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	4433/7/FK/C1
Tgl.	4-8-06

**Dipertahankan di depan Panitia Penguji Karya Akhir
Bagian /SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RS Dr. Kariadi Semarang**

Menyetujui

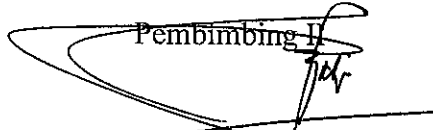
Pembimbing I



DR. Dr. Prasetyowati Subchan, Sp KK(K)

NIP: 130 530 279

Pembimbing II



Dr. Paulus Yogyartono, Sp KK(K)

NIP 140 147 110

Karya Akhir ini dikerjakan di Laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin FK UGM
Yogyakarta

Mengetahui

Ketua Bagian /SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
RS Dr. Kariadi Semarang



Dr. Sugastiasri Sumaryo, Sp KK(K)

NIP. 130 354 880

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Alloh SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang berkat rahmat dan hidayahNya sehingga saya mendapat kesempatan serta kemampuan untuk menyelesaikan karya akhir ini dengan judul :

**PENGARUH SINAR ULTRAVIOLET B, DAN HORMON GENOTROPIN®
PADA BIAKAN FIBROBLAS JARINGAN KULIT MANUSIA, KAJIAN
DENGAN *AGYROPHILIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION* DAN
FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE.**

Sebagai salah satu syarat kelulusan bagi peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis I dalam bidang studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Direktur Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang, saya mengucapkan banyak terima kasih atas ijin dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan spesialisasi di Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada yang terhormat :

1. Dr. Sugastiasri Sumaryo, SpKK (K), Ketua Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk belajar di bagian ini serta atas bimbingan, dorongan dan nasehat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
2. Dr. S. Indrayanti, SpKK (K), Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang, yang telah memberikan kesempatan untuk belajar di bagian ini kepada saya selama mengikuti pendidikan spesialisasi.

3. DR. Dr. Prasetyowati Subchan, SpKK (K); selaku pembimbing utama, yang banyak memberikan petunjuk, koreksi, masukan, arahan, dorongan, bimbingan dan nasehat dalam penyusunan karya akhir ini sehingga dapat selesai.
4. Dr. Paulus Yogyartono, Sp KK (K), yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan nasehat selaku pembimbing kedua dalam penyusunan karya akhir ini.
5. Prof. dr. Kabulrachman, Sp KK (K), Guru Besar Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk belajar di bagian ini serta atas bimbingan, dorongan dan nasehat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
6. Dr. R. Sri Djoko Susanto, SpKK (K), selaku Sekretaris Program Studi Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang yang juga banyak memberikan bimbingan, dorongan dan nasehat yang berharga dalam saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
7. Dr. Asih Budiastuti, SpKK (K), selaku Sekretaris Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang yang juga banyak memberikan bimbingan, dorongan dan nasehat yang berharga dalam saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
8. Dr. S. Buditjahjono, SpKK (K), dr.Subakir,SpKK (K), dr. Soejoto, SpKK (K), dr. Irma Binarso SpKK (K), dr. TM. Sri Redjeki SpKK (K), dr.Lewie Suryaatmaja, SpKK (K), dr. Meilien Himbawani SpKK (K), dr. Dhiana Ernawati SpKK (K), dr.med, Kun Jayanata SpKK (K), dr.Diah Adriani Malik SpKK, dr. Retno Indar, SpKK, dan dr.Muslimin SpKK, atas segala bimbingan, petunjuk, dan nasehat yang berguna selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
9. Prof. Dr. dr. Hardyanto Soebono, SpKK (K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/ Rumah Sakit Dr. Sardjito Yogyakarta atas ijin yang diberikan kepada saya untuk melakukan penelitian di FK UGM.
10. Dr. Y. Widodo Wirohadidjojo, SpKK (K), selaku Ketua Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/

Rumah Sakit Dr. Sarjito Yogyakarta yang telah memberi ijin, meringankan penelitian saya sampai selesainya.

11. Dr. Fajar Waskito, MS SpKK (K), Ketua Program Studi Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/ Rumah Sakit Dr. Sarjito Yogyakarta, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian.
12. Bp. Moh Zen Rahfiludin, SKM, yang telah memberikan petunjuk dan membantu dalam menyusun proposal dan pengolahan datanya.
13. Seluruh teman sejawat Program Pendidikan Dokter Spesialis, paramedis, karyawan di Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang atas segala bantuan dan kerjasamanya selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
14. Kedua orang tua, keluarga, saudara dan segenap keluarga besar saya yang selalu memberi semangat dan doa selama saya menjalani pendidikan.

Kiranya Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang selalu melimpahkan berkah dan rahmatNya berupa keikhlasan dan segala budi baik dari semua pihak yang telah membantu dan memperkenankan saya dalam menyelesaikan proses pendidikan spesialisasi di Bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin ini.

Akhir kata semoga karya akhir ini dapat memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya dan segala kritik serta saran yang membangun senantiasa akan saya terima dengan kebesaran hati.

Semarang Desember 2005

Khoirul Hadi

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i.
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii.
PRAKATA.....	iii.
DAFTAR ISI.....	vi.
DAFTAR SINGKATAN.....	viii.
INTISARI.....	ix
BAB I	
PENDAHULUAN.....	1.
LATAR BELAKANG MASALAH.....	1.
A. RUMUSAN MASALAH.....	3.
B. ORISINALITAS PENELITIAN.....	4.
C. TUJUAN PENELITIAN.....	4.
D. MANFAAT PENELITIAN.....	5.
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6.
A. PROSES MENUA KULIT.....	6.
B. PERUBAHAN PADA KULIT MENUA.....	7.
C. PATOFISIOLOGI KULIT MENUA.....	8.
D. TERAPI ANTI PENUAAN.....	11.
E. <i>HUMAN GROWTH HORMONE</i>	13.
F. KOLAGEN DAN FIBROBLAS.....	16.
G. BIAKAN FIBROBLAS.....	18.
H. <i>FIBROBLAS POPULATED COLLAGEN LATTICE</i>	20.
I. <i>AGYROPHYLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION</i>	21.
J. GENOTROPIN.....	22.
K. SINAR ULTRAVIOLET B.....	23.
L. KERANGKA TEORI.....	24.
M. KERANGKA KONSEP.....	25.
N. HIPOTESIS.....	26.

BAB III. METODE PENELITIAN.....	27
A. RANCANGAN PENELITIAN.....	27
B. POPULASI DAN SAMPEL.....	30
C. VARIABEL PENELITIAN.....	31
D. BAHAN PENELITIAN.....	31
E. ALAT PENELITIAN.....	32
F. TEMPAT DAN LAMA PENELITIAN.....	33
G. DEFINISI OPERASIONAL.....	34
H. ALUR PENELITIAN.....	36
I. PENYIAPAN JARINGAN DONOR DAN KULTUR.....	37
J. PEMBUATAN <i>FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE</i>	39
K. CARA MENGUKUR DENGAN <i>SCION IMAGE</i>	40
L. MEMBUAT AgNOR DAN MENGHITUNG INDEK PROLIFERASI.....	41
M. ANALISA DATA.....	42
N. KESULITAN PENELITIAN.....	43
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	44
A. SINTESIS KOLAGEN BERDASAR PERSENTASE KONTRAKSI	44
B. PROLIFERASI FIBROBLAS.....	74
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	78
A. KESIMPULAN.....	78
B. SARAN	79
DAFTAR PUSTAKA.....	80
LAMPIRAN	
A. LAMPIRAN ANALISIS DATA.....	74
B. FOTO ALAT-ALAT, MEDIUM, HASIL.....	84

DAFTAR SINGKATAN

1. AgNOR (*Agyrophylic Nucleolar Organizer Region*)
2. BMI (*Body Mass Index*)
3. CPD (*CyclobutanePyrimidine Dimmer*)
4. DMEM (*Dubelcos Modified Essential Medium*)
5. FCS (*Fetal Calf Serum*)
6. FPCL (*Fibroblast Populated Collagen Lattice*)
7. GH (*Genotropin*)
8. HGH (*Human Growth Hormone*)
9. HGBP (*Human Growth Binding Protein*)
10. IGF (*Insulin-like Growth Factor*)
11. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)
12. MMP (*Matrixs Metalloproteinase*)
13. ROS (*Reactive Oxygen Species*)
14. UVA (*Ultra Violet A*)
15. UVB (*Ultra Violet B*)

ABSTRACT

Solar UV rays exposure plays a pivotal role in skin aging. It causes extracellular collagen matrix damage and defective collagen synthesis in cellular level. One way to fight aging is by giving hormone replacement therapy using Human Growth Hormone. Several recombinant products have been developed, one of these is genotropin® hormone. In several in vivo studies, genotropin® has been shown to delay aging, but in vitro studies to investigate the ability of genotropin® to fight aging process in fibroblast culture have never been performed. This study seeks to assess the role of genotropin® in inhibiting aging process caused by UVB exposure towards fibroblast proliferation and collagen synthesis in fibroblast culture taken from normal human skin tissue. The assessment was performed by measuring the value of proliferation index in Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) and contraction levels on Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL).

This was a laboratory experimental study using posttest-only control group design with cells cultured in cell culture wells as the research unit samples. The samples were exposed to UVB with doses of 10, 20 and 30 mJ/cm² and genotropin® with doses of 30, 50 and 100 µIU/mL in fibroblasts cultured within collagen network. The fibroblasts were derived from cultured healthy human skin tissue taken from the back of an 18 years old donor.

Collagen synthesis underwent significant reduction when exposed to UVB radiation with increasing doses. On the other hand, the sample groups given genotropin® with increasing doses showed increased collagen synthesis. This also occurred to combination treatment groups, which were the groups receiving genotropin® with increasing doses and UVB radiation dose of 20 mJ/cm² and 30 mJ/cm² if compared with control groups. Besides, increasing doses of genotropin® hormone influenced the fibroblast proliferation index compared to the control group. The greater the dose of genotropin® hormone, the higher the fibroblast proliferation index compared to control groups.

Key word : UVB, genotropin, fibroblast, collagen proliferation and synthesis, FPCL, AgNOR.

ABSTRAK

Sinar ultraviolet matahari berperan dalam menyebabkan penuaan kulit, yaitu mengakibatkan kerusakan kolagen matriks ekstraseluler dan kerusakan sintesis kolagen pada tingkat seluler. Terapi sulih hormon dengan genotropin® adalah salah satu cara untuk menunda penuaan. Terdapat beberapa penelitian *in vivo* genotropin terbukti dapat menunda penuaan, akan tetapi penelitian *in vitro* untuk melihat kemampuan genotropin® menunda penuaan terhadap biakan kultur fibroblas belum pernah dilakukan. Penelitian ini ingin mengetahui peranan genotropin® dalam menunda proses penuaan yang disebabkan paparan UVB terhadap proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan kultur fibroblas dari jaringan kulit manusia. Penilaian dilakukan dengan menghitung nilai indek proliferasi pada *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR), dan derajat kontraksi pada *Fibroblast Populated Collagen Lattice* (FPCL).

Dengan rancangan penelitian eksperimental laboratorik, pendekatan *posttest-only control group design* menggunakan kultur sel dalam sumuran sebagai sampel unit penelitian. Sel fibroblas berasal dari kultur jaringan kulit manusia dari seorang donor. Diberikan perlakuan paparan sinar ultraviolet- B dosis 10 mJ/cm², 20 mJ/cm², 30 mJ/cm² dan genotropin® dosis 30 µIU/ml, 50 µIU/ml dan 100 µIU/ml pada biakan kultur fibroblas di dalam kisi-kisi kolagen..

Hasilnya sintesis kolagen mengalami penurunan bermakna ketika mendapat paparan UVB dengan dosis semakin meningkat. Sebaliknya kelompok paparan genotropin® dengan dosis yang semakin meningkat, sintesis kolagen juga semakin meningkat. Demikian juga terhadap kelompok yang mendapat perlakuan kombinasi dosis genotropin® yang semakin meningkat dan UVB dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu ada pengaruh paparan hormon genotropin® dosis semakin besar terhadap indeks proliferasi fibroblas bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Semakin besar dosis paparan hormon genotropin®, indeks proliferasi fibroblas semakin meningkat bila dibandingkan kelompok kontrol.

Kata kunci : UVB, genotropin®, fibroblas, proliferasi dan sintesis kolagen, FPCL, AgNOR

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG PENELITIAN

Proses menua akan dialami oleh setiap manusia. Proses ini bersifat dinamis dan merupakan akumulasi secara progresif berbagai perubahan patologis di dalam sel dan jaringan yang terjadi seiring dengan berjalannya waktu¹. Kulit sebagai organ terluar dari tubuh menjadi bagian yang paling mudah diamati dengan terjadinya perubahan akibat proses menua. Terdapat dua macam penuaan yaitu penuaan sejati (*true aging*) disebabkan oleh proses fisiologik dan genetik, dan penuaan dini (*photoaging*) yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan terutama paparan sinar ultraviolet. Pada kulit menua terdapat tanda-tanda klinis berupa kulit kering, kasar, keras, berkerut, kendur atau longgar, kelainan pigmentasi, dan beberapa kelainan keganasan^{1,2}.

Paparan sinar ultraviolet dari matahari menyebabkan terjadinya peradangan dan akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) yang berperan penting dalam penuaan kulit manusia. Pengaruh lingkungan seperti sinar ultraviolet, asap rokok, polutan, temperatur, nutrisi, dan gaya hidup semua memberikan kontribusi dalam pembentukan radikal bebas dan ROS sehingga merangsang peradangan kulit. Peradangan ini akan memicu serangkaian reaksi biokimia di kulit yang menyebabkan kerusakan jaringan kolagen dermis sehingga terjadi penuaan kulit dini (*photoaging / premature skin aging*)^{3,4}.

Sinar ultraviolet sebagai faktor external utama penyebab terjadinya penuaan dini dimana paparan sinar ultraviolet pada kulit akan menyebabkan kerusakan kolagen matrik ekstraseluler dan kerusakan sintesis kolagen pada tingkat seluler. Pada kerusakan tingkat

seluler paparan sinar ultraviolet dapat secara langsung menyebabkan kerusakan DNA (*DNA damage*), atau melalui induksi radikal bebas *reactive oxygen spesies* (ROS) yang menyebabkan serangkaian kerusakan oksidatif (*oxidative damage*) pada mitokondria DNA (mtDNA) dan juga menyebabkan mutasi ataupun kematian sel yang berpengaruh pada sintesis kolagen. Paparan sinar ultraviolet juga akan menginduksi sintesis keluarga enzim matrik metalloproteinase (MMP), merupakan enzim proteolitik yang mendegradasi kolagen. Enzim MMP-1 merusak kolagen tipe I, II, III, sedang MMP-9 atau juga disebut sebagai enzim gelatinase merusak kolagen tipe IV, V, dan gelatin⁴.

Terdapat banyak metoda dan cara untuk melawan penuaan atau mengembalikan keadaan kearah muda (*anti-aging*), baik dalam bentuk pemberian obat-obatan topikal ataupun sistemik, beberapa teknik pembedahan, dan pemberian terapi sulih hormon (*hormone replacement therapy*). *Human growth hormone* (HGH = somatropin) dianggap sebagai hormon utama untuk melawan penuaan, berefek hampir pada setiap sel dari tubuh manusia, mengembalikan kulit dan tulang menjadi muda dan sebagai pendahulu terhadap hormon-hormon lainnya⁵. Penelitian Rudman D, melaporkan bahwa pemberian HGH dapat mengembalikan dan membalikkan proses penuaan kearah muda lagi, dimana terjadi peningkatan massa otot dan densitas tulang, berkurangnya timbunan lemak, fungsi ginjal, paru, jantung membaik, kulit menjadi lebih tebal, lembut dan melebatkan rambut pada semua subyek penelitiannya^{5,6}.

Dengan kemajuan teknologi, saat ini telah dikembangkan beberapa produk rekombinan dari HGH salah satunya adalah hormon genotropin[®] (GH). Telah banyak penelitian *in vivo* menunjukkan pemakaian genotropin memberikan hasil peningkatan massa otot, densitas tulang, perbaikan sendi, fungsi ginjal, hati, paru dan kulit. Cranton

MD, menunjukkan bahwa pada pasien-pasien yang diberi GH terjadi penebalan kulit dan hilangnya keriput karena terjadi perbaikan sintesis kolagen dan hidrasi kulit^{6,7}.

Sinar ultraviolet B (UVB) dengan panjang gelombang 290-320 nm dapat secara langsung menyebabkan kerusakan sel atau menginduksi aktivitas ROS dan MMP yang menyebabkan kerusakan kolagen. Banyak penelitian *in vivo* atau *in vitro* yang menyebabkan kerusakan kolagen. Banyak penelitian *in vivo* atau *in vitro* yang menggunakan UVB untuk menginduksi terjadinya penuaan. Pada berbagai penelitian *in vivo* terbukti hormon genotropin dapat menunda penuaan dan mengembalikan kondisi tubuh ke arah muda lagi, akan tetapi penelitian secara *in vitro* untuk melihat kemampuan hormon genotropin melawan proses penuaan pada biakan fibroblas belum pernah dilakukan^{4,7}.

Dengan alasan tersebut di atas, maka peneliti ingin mengetahui peranan hormon genotropin dalam menghambat proses penuaan yang disebabkan paparan UVB terhadap sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas yang diambil dari jaringan kulit normal manusia. Penilaian dilakukan dengan menghitung derajat kontraksi pada *Fibroblast Populated Collagen Latice* (FPCL) dan nilai indek proliferasi pada *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR).

B. RUMUSAN MASALAH

Apakah hormon genotropin dapat menghambat proses penuaan pada biakan fibroblas dari jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan dengan UVB?

C. ORISINALITAS PENELITIAN

Banyak penelitian yang mengupas tentang pengaruh sinar ultraviolet baik UVA maupun UVB terhadap efek apoptosis, penuaan, kematian sel, dan pengaruh karsinogenesis terhadap kulit yang dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro* pada manusia ataupun hewan. Sinar ultraviolet telah terbukti sebagai faktor penyebab terjadinya penuaan dan kerusakan terhadap sel-sel kulit.

Hormon genotropin adalah merupakan produk rekombinan dari HGH di mana banyak penelitian *in vivo* yang membuktikan HGH sebagai hormon anti penuaan. Penelitian ini memberikan wacana baru tentang efek antagonisme antara sinar ultraviolet yang dianggap sebagai penyebab penuaan dan hormon genotropin sebagai anti penuaan sehingga diharapkan dapat memunculkan formulasi dan pemahaman baru tentang beberapa cara mengatasi penuaan.

D. TUJUAN PENELITIAN

- TUJUAN UMUM :

Mengetahui pengaruh paparan sinar UVB serta pengaruh hormon genotropin® dalam menghambat ataupun menstimulasi proliferasi fibroblas dan atau sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia.

- TUJUAN KHUSUS :

1. Membuktikan ada tidaknya pengaruh UVB terhadap proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan sinar UVB.

2. Membuktikan ada tidaknya pengaruh hormon genotropin terhadap proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan hormon genotropin®.
3. Membuktikan adanya perbedaan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan kombinasi hormon genotropin dan sinar UVB dan biakan fibroblas yang tidak diberi paparan sinar UVB maupun hormon genotropin®.
4. Membuktikan adanya perbedaan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia antara yang diberi paparan kombinasi hormon genotropin dan sinar UVB dengan biakan fibroblas yang diberi paparan sinar UVB atau hormon genotropin® saja.

E. MANFAAT PENELITIAN

1. Mengetahui seberapa besar pengaruh sinar UVB terhadap penuaan kulit serta efek anti penuaan hormon genotropin® atau kombinasinya terhadap proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia.
2. Sebagai titik tolak untuk penelitian lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. PROSES MENUA KULIT

Sembilan puluh persen penyakit orang dewasa disebabkan karena proses degenerasi yang diasosiasikan dengan aging atau penuaan. Aging adalah penuaan, berapapun usia kronologisnya. Dalam proses ini terjadi penurunan efisiensi fisiologis secara progresif sesudah fase reproduktif. Proses menua terjadi pada semua organisme multiseluler. Organ-organ dalam tubuh manusia mengalami aging dengan kecepatan yang berbeda dan organ yang sama pada individu yang berbeda mengalami penuaan dengan kecepatan yang juga berbeda^{1,2,4}.

Terdapat beberapa teori tentang penuaan, antara lain : teori pakai dan rusak, teori neuro-endokrin, teori kontrol genetik, teori radikal bebas dan teori telomerase. Teori pakai dan rusak mempercayai bahwa tubuh dan sel-selnya rusak karena banyak terpakai dan digunakan secara berlebihan. Teori neuro-endokrin menekankan bahwa dengan bertambahnya usia menyebabkan beberapa hormon kita akan berkurang sehingga kemampuan tubuh untuk memperbaiki diri sendiri (*self repaired*) dan mengatur sendiri (*self regulation*) menjadi menurun. Teori kontrol genetik menyebutkan bahwa setiap manusia sudah memiliki program genetik dalam DNA masing-masing, yang akan mengatur fungsi fisik dan mental masing-masing individu. Pada teori radikal bebas disebutkan bahwa semua sumber kerusakan dan penuaan pada semua sel sampai dengan organ tubuh adalah karena radikal bebas. Teori telomerase merupakan teori proses menua

paling baru. Telomerase adalah enzim yang mengatur panjang telomer merupakan urutan asam nukleat yang berada di ujung kromosom. Karena proses mitosis yang terus menerus telomer akan memendek sampai tidak mampu membelah lagi dan teori ini kemungkinan paling banyak menjanjikan untuk menguraikan terjadinya penuaan^{1,3,4}.

Penuaan kulit mempunyai dua fenomena yang saling berkaitan, yaitu penuaan intrinsik dan penuaan ekstrinsik. Penuaan intrinsik (*intrinsic aging*), berlangsung secara alamiah, tidak dapat dicegah dan mengakibatkan perubahan kulit yang menyeluruh sesuai dengan bertambahnya usia, disebabkan oleh berbagai faktor fisiologik dari dalam tubuh sendiri seperti genetik, hormonal dan ras. Penuaan ekstrinsik (*extrinsic aging*), proses ini disebabkan oleh berbagai faktor dari luar tubuh yang menginduksi terjadinya penuaan kulit (proses menua dini atau *premature aging*)^{3,4}. Gambaran penuaan dini tidak bersifat menyeluruh, lebih jelas terlihat di daerah wajah, telinga, leher belakang dan samping, lengan dan punggung tangan. Paparan sinar matahari yang berlebihan akan mempercepat penuaan dini (*photoaging* atau *dermatoheliosis*). Faktor lain yang dapat mempengaruhi penuaan ini antara lain bahan-bahan yang dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas seperti sinar x, paparan bahan kimia, asap rokok dan polutan, serta kebiasaan dan cara perawatan kulit yang salah⁸.

B. PERUBAHAN PADA KULIT MENUA

Pada kulit menua secara klinis dijumpai kulit kering dan kasar (*xerosis cutis*) yang disebabkan oleh berkurangnya lemak permukaan kulit atau kandungan air, terlihat kemerahan, bersisik dan terdapat retak-retak halus. Kulit berkerut dan longgar (*wrinkle, laxity*) serta garis-garis kulit tampak jelas, disebabkan oleh serabut kolagen dan elastik

kehilangan elastisitas, serta berkurangnya lapisan lemak subkutis. Pada kulit menua juga sering dijumpai bercak ketuaan atau bercak pigmentasi (*mottled pigmentation*) berupa frekles, melasma atau lentigen serta beberapa kelainan ke arah keganasan seperti keratosis seboroik, keratosis aktinik dan lesi prakanker^{2,3,4,8}.

Perubahan histopatologis pada penuaan kulit sejati menunjukkan epidermis atropi tanpa perubahan stratum korneum, rete-ridge mendatar, dermis atropi, penurunan jumlah fibroblas, serabut kolagen, serabut elastik dan jaringan lemak subkutan. Pada penuaan kulit dini terlihat epidermis dan stratum korneum menebal, "rete-ridge" mendatar, degenerasi serabut kolagen dengan peningkatan serabut elastik yang menimbulkan dermal elastosis pada dermis tanpa perubahan jaringan lemak subkutan^{9,10}.

Pada penuaan kulit juga terjadi perubahan fungsional kulit. Seperti kita ketahui pada masa bayi fungsi kulit belum sempurna karena masih dalam tahap perkembangan, fungsinya mencapai optimal pada usia dewasa. Pada kulit menua terjadi berbagai perubahan fungsional, misalnya penurunan fungsi proteksi, fungsi imun, persepsi sensoris, perubahan sistem pengaturan suhu badan, serta penurunan produksi sebum dan keringat^{10,11}.

C. PATOFISIOLOGI PROSES MENUA

Paparan sinar ultraviolet baik akut maupun kronis pada kulit akan menginduksi serangkaian reaksi biokimia berantai yang menyebabkan terjadinya kerusakan intraseluler dan ekstraseluler fibroblas. Keadaan ini akan berpengaruh pada kerusakan kolagen dan kematian sel atau mutasi sel yang mengakibatkan penurunan sintesis protein kolagen dan pada akhirnya menyebabkan terjadi penuaan dini. Penuaan kulit dini secara biokimia khas ditandai adanya serabut elastik abnormal di dalam dermis dan menurunnya tipe

kolagen tertentu secara dramatis. Pada penuaan dini terjadi penipisan epidermis dan dermis sehingga kulit berkerut, terdapat peningkatan aktivitas enzim proteolitik dan pergantian matrik ekstraseluler abnormal yang berpengaruh terhadap berkurangnya kolagen dan serabut elastik didalam dermis sehingga elastisitas kulit menjadi hilang. Sinar ultraviolet (UV) mengandung energi foton yang akan membangkitkan reaksi bertingkat di dalam jaringan dan sel-sel kulit melalui beberapa mekanisme^{8,12}.

Pertama, sinar UV mengandung energi foton dimana DNA berlaku sebagai kromofor yang menyerap energi foton dan menghasilkan *photoproduct* di antaranya *cyclobutan pyrimidin dimmer* (CPD). Apabila tubuh tidak dapat menetralsir *photoproduct* ini melalui gena p53 (gena perlindungan) maka akan menyebabkan kerusakan DNA (*DNA damage*) dan selanjutnya mengakibatkan kematian sel fibroblas. Dengan demikian kemampuan sintesis protein dan proliferasi sel fibroblas akan berhenti atau menurun^{13,14}.

Kedua, paparan UV akan menginduksi beberapa beberapa sitokin peradangan antara lain IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 dan TNF- α yang akan menginduksi keluarnya sel-sel PMN dari pembuluh darah dan akan memproduksi beberapa zat peradangan. Melalui mekanisme signal tranduksi zat peradangan tadi akan menginduksi produksi beberapa macam enzim *matrix metalloprotease* (MMP). Enzim MMP ini adalah golongan enzim proteolitik yang terdiri dari MMP-1-MMP-13, dan MMPs, setiap MMP mempunyai aktivitas sendiri-sendiri terhadap tipe kolagen tertentu, MMP-1, MMP-3 (kolagenase) merusak kolagen tipe I, II, dan III, dan MMP-2, MMP-9, dan MMPs akan merusak komponen matrik eksraseluler (ECM) non kolagen dermis termasuk *basement membrane*, glikoprotein dan proteoglikan¹⁵. Proses kerusakan kolagen dermis oleh MMP ini akan

terjadi secara simultan menyebabkan terbentuknya elastosis dan *scar solar*. Akumulasi dari *scar solar* ini secara klinis akan tampak sebagai kerut di permukaan kulit atau yang dinamakan sebagai *photoaging*. Secara alamiah aktivitas MMP ini akan dibatasi oleh *tissue inhibitors of matrix metalloproteases* (TIMPs) dalam keadaan seimbang, sehingga degradasi kolagen tidak berlangsung secara berlebihan. Dalam keadaan normal antara MMP dan TIMPs berada dalam konsentrasi seimbang dengan perbandingan 1 : 1, apabila kadar MMP terinduksi dalam jumlah tinggi akan menyebabkan kerusakan kolagen yang tinggi pula karena TIMPs tidak mampu menghambatnya^{15,16}.

Ketiga, paparan sinar UV pada kulit melalui energi fotonnya akan menghasilkan beberapa *photoproduct* yang membangkitkan radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan sekelompok molekul oksigen reaktif dengan satu elektron yang sangat reaktif untuk berikatan dengan molekul lain. *Reactive oxygen species* ini terdiri dari 4 spesies yaitu : *superoxid anion* (O_2^-), *hydrogen peroxide* (H_2O_2), *hydroxyl radicals* (OH), dan *singlet oxygen* (O_2).¹⁷ Keberadaan ROS ini akan memicu reaksi biokimiawi molekuler sangat luas baik pada tingkat seluler maupun ekstraseluler yang akan berpengaruh pada berbagai macam fenomena biologi seperti terjadinya mutasi, karsinogenesis, penuaan, atherosklerosis, iskemia, diabetes mellitus, dan beberapa penyakit degeneratif. Melalui serangkaian reaksi perangsangan baik secara transkripsi atau melalui jalur signal transduksi ke nukleus, radikal bebas ini akan menyebabkan menurunnya antioksidan alamiah tubuh. Selanjutnya akan menyebabkan stres oksidatif, dan apabila stres oksidatif ini berlangsung terus-menerus akan menyebabkan terjadi kerusakan oksidatif¹⁸. Kerusakan oksidatif ini akan menyebabkan kerusakan komponen-komponen intraseluler atau menyebabkan lisis membran sel yang pada akhirnya akan

menyebabkan kerusakan dan kematian sel sehingga kemampuan reproduksi dan kemampuan proliferasi sel juga akan berhenti. Secara bersamaan melalui perangsangan jalur signal transduksi, ROS juga dapat menginduksi sintesis keluarga enzim matrix metalloproteinases (MMP) yang akan ikut mendegradasi kolagen dermis. Akumulasi dari kerusakan kolagen dermis oleh MMP dan kematian sel khususnya sel fibroblas ini akan menyebabkan kerusakan kolagen dermis sehingga akan tampak tanda-tanda klinis dari penuaan dini (*photoaging*)¹⁸.

D. TERAPI ANTI PENUAAN (ANTI-AGING)

Terdapat banyak metoda yang selalu berkembang untuk mencegah terjadinya penuaan dini (*photoaging*) atau mengembalikan penuaan ke arah muda lagi. Beberapa di antaranya dapat dalam bentuk pemakaian obat-obatan baik topikal atau sistemik, tindakan bedah, dan terapi sulih hormon¹⁹.

Untuk mencegah atau melindungi kulit dari paparan UV dapat dengan menggunakan pelindung fisik dan memakai tabir surya (*sunscreens*). Tabir surya ini dapat menyerap atau memantulkan energi foton yang terkandung di dalam sinar UV¹⁹.

Pemakaian obat-obatan sering dalam bentuk topikal atau sistemik, di mana yang paling banyak berupa golongan antioksidan. Di dalam tubuh antioksidan diperlukan sebagai mekanisme pertahanan untuk melawan dan mengikat radikal bebas. Terdapat dua golongan antioksidan yaitu antioksidan enzimatis berupa *superoxide dismutase* (SOD), *glutathion peroxidase* (GPX), *catalase* (CAT), *glutaredoxin* (GRX), dan *thioredoxin* (TRX) yang secara endogen dibuat oleh tubuh dan antioksidan non-enzimatis yang berasal dari makanan dalam bentuk vitamin E, vitamin C, betakaroten, flavonoid/

polyfenol, glutation, hormon dan ubiqinon. Karena tubuh manusia tidak mampu membuat antioksidan non-enzimatik maka diperlukan intake antioksidan ini dari luar dalam bentuk makanan atau suplemen vitamin^{17,20}.

Pemakaian topikal asam retinoat /tretinoin dan asam alfa hidroksi (AHA), mampu menghalangi kerusakan kolagen dermis dan meningkatkan matrik ekstraseluler glikosaminoglikan.¹⁹ Banyak penelitian yang membuktikan bahwa asam retinoat dapat menjadi anti aging dengan jalan menekan *gena matrik metaloprteinases* (gena MMP) untuk tidak memproduksi MMP. Dengan tidak terinduksi MMP di dalam dermis maka kolagen dermis tidak mengalami degradasi dan kerusakan^{19,21}.

Banyak tindakan pembedahan yang bertujuan untuk rejuvanasi /menjadi muda kembali dengan berbagai metoda, di antaranya adalah *face lifting*, dermabrasi, mikrodermabrasi, *soft tissue augmentation*, *chemical peeling*, dan laser untuk rejuvanasi. Pilihan metoda disesuaikan dengan keadaan klinis, harapan, dan sosial ekonomi pasien^{19,20}.

Terapi sulih hormon sekarang mulai dikembangkan dan telah melalui banyak penelitian yang memperdalam tentang cara untuk mencegah penuaan atau mengembalikan kondisi menjadi muda lagi. Pemberian terapi sulih hormon ini mengacu pada teori menurunnya hormon tubuh yang menyebabkan suatu organisme menjadi tua, sehingga dengan mengembalikan hormon tertentu di dalam tubuh seperti kadar hormon sewaktu muda, akan menghantarkan seseorang kembali muda. Beberapa hormon yang digunakan untuk terapi sulih hormon itu adalah estrogen, dehidro epiandrosteron (DHEA), testosteron, androgen, dan *human growth hormone* (HGH)^{19,20}.

E. HUMAN GROWTH HORMON (HGH)

Human growth hormone (HGH) atau somatomedin adalah polipeptida rantai tunggal dengan 191 asam amino yang diproduksi oleh sel-sel somatotropik yang menempati 50 % bagian anterior kelenjar hipofisis. Struktur HGH mirip dengan *human Placental Lactogen* (hPL) /*chorionic somatomammotropin*. Keduanya dapat ditemukan pada kromosom yang sama dan tampaknya berasal dari duplikasi gen yang sama pula²².

Sekresi HGH terutama diatur oleh hipotalamus yang memproduksi *GH releasing hormone* (GHRH) yang berfungsi merangsang sekresi dan somatostatin berfungsi menghambat sekresi. *Human Growth Hormon* disekresikan ke dalam sirkulasi secara pulsatif dengan kadar rata-rata yang rendah dalam darah dan mempunyai waktu paruh 20-30 menit saja. Amplitudo pulsa tersebut meningkat selama tidur gelombang rendah terutama 3-4 jam pertama. Sekresi HGH juga meningkat sesudah berolah raga atau setelah mendapat stressor tertentu. Sekresi tersebut menurun pada keadaan obesitas, depresi dan hiperglikemia.²² Setiap kenaikan 1 angka dari indeks massa tubuh normal (*body mass index*/BMI) akan menurunkan sekresi HGH sebanyak 6%. Wanita usia produktif diketahui mensekresi HGH lebih tinggi daripada pria yang sama. Proses stimulasi oleh GHRH tergantung pada kalsium dan diperantarai oleh *cyclic adenosine monophosphat* (cAMP). Respon HGH terhadap GHRH menurun pada usia di atas 40 tahun sehingga terjadi penurunan sekresi HGH sebanyak 14% dan waktu paruh menurun 6% setiap 1 dekade.²² Kadar IGF-1 di bawah normal dapat disebabkan karena malnutrisi, penyakit hepar, diabetes mellitus tidak terkontrol dan hipotiroid. IGF-1 berikatan dengan IGF-binding protein (IGF-BP) dan mempunyai waktu paruh 3-18 jam sehingga kadar

kompleks ini relatif konstan dalam sirkulasi dibanding HGH. Kadar IGF-1 di sirkulasi darah juga akan menurun sesuai dengan keberadaan kadar HGH, pada usia 20-30 tahun kadarnya 150-100 μ IU/ml, pada usia 40-50 tahun kadarnya 70-50 μ IU/ml, sedang pada usia 50-60 tahun kadarnya 40-30 μ IU/ml dan pada usia diatas 70 tahun kadarnya 20-0 IU/ml²³.

Terapi sulih hormon, sekarang tidak lagi memakai *growth hormone* manusia akan tetapi menggunakan produk *growth hormone recombinant*, diantaranya adalah genotropin. Pemberian GH eksogen bertujuan untuk memperbaiki keadaan abnormal yang diasosiasikan dengan defisiensi GH dan mencegah konsekuensi yang ditimbulkan oleh defisiensi GH jangka panjang. Disamping digunakan untuk terapi sulih hormon yang bertujuan untuk mengembalikan keadaan menjadi muda lagi.²⁴,

Tubuh manusia memberikan respon yang berbeda pada pemberian GH eksogen tergantung BMI, GHBP basal, usia dan jenis kelamin. Terapi GH sebaiknya dimulai dengan dosis rendah yaitu 3-4 μ g/kg BB/hari. Sebuah pedoman terapi yang dipublikasikan majalah *Endocrine Practice* 1998 menunjukkan bahwa dosis pemeliharaan yang diharuskan manusia usia > 35 tahun umumnya < 0,1 mg/hari. Dengan berat badan 70 kg, dosis yang diperlukan tidak melebihi 0,4 mg/hari yang di berikan secara subkutan. Dosis dapat dinaikkan sesuai kebutuhan dengan maksimum 1,75 mg/hari (maksimum 25 μ g/kg BB/hari) untuk pasien usia < 35 tahun dan 0,875 mg/hari (maksimum 12,5 μ g/kg BB/hari) untuk usia >35 tahun. Dosis ini perlu selalu disesuaikan kembali karena kemungkinan kelebihan dosis pada pasien obesitas dan pada pasien usia lanjut serta kemungkinan kekurangan dosis pada pasien wanita²⁵.

Mekanisme kerja *Human growth hormone* belum sepenuhnya dipahami akan tetapi *growth hormone* dapat merupakan stimulator langsung terhadap organ target pertumbuhan atau secara tidak langsung melalui faktor serum yang disebut somatomedin atau *insulin-like growth factors* (IGF). Ada dua jenis somatomedin yang dikenal: somatomedin-A dan somatomedin-C. Somatomedin-C atau IGF-1 adalah stimulator pertumbuhan yang utama dan diproduksi terutama oleh hepar dan sebagian kecil lainnya oleh tulang, otot, tulang rawan, ginjal, paru, jantung, dan sel-sel kulit. IGF-1 ini pula yang akan meningkatkan pertumbuhan jaringannya sendiri dan sekitarnya dengan cara autokrin atau parakrin mengaktifkan berbagai *growth factor* termasuk *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *tissue inhibitory matrix metalloproteinases* (TIMP) dan memperbaiki sistem imun. Faktor-faktor pertumbuhan ini akan merangsang proliferasi sel fibroblas serta mengaktifkan sistem metabolisme intrasel melalui mitokondria dan RNA untuk meningkatkan sintesis protein termasuk sintesis kolagen oleh sel fibroblas²⁶. Di samping itu, Grace Wong dkk, menunjukkan bahwa *growth hormone* merupakan suatu antioksidan yang paling baik dari antioksidan yang pernah ditemukan, bekerja melindungi sel dari kerusakan proteolitik dan kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas²⁷.

Menurut Ronald Klatz, HGH merupakan terapi utama untuk anti-aging, yang mempunyai efek hampir pada setiap sel dalam tubuh, yaitu menjadikan kulit dan tulang kembali muda, terjadi regenerasi sel-sel jantung, hati, paru, dan ginjal, menyebabkan fungsi organ dan jaringan kembali muda. Selain itu HGH menyebabkan revitalisasi sistem imun, merendahkan faktor resiko terhadap serangan jantung dan stroke, memperbaiki pengambilan oksigen dan mencegah terjadinya osteoporosis. *Human*

dada, pinggang, perut, pinggul, paha, dan dalam waktu yang bersamaan terjadi peningkatan massa otot. Suatu aprodisiak yang paling kuat untuk mengibarkan kembali kemampuan seksual pada laki-laki. Selain itu efek HGH membuat kulit menjadi lembut, kerut berkurang, mengembalikan elastisitas, ketebalan, kelembaban dan kontur kulit menjadi kembali muda lagi. Dilaporkan juga kulit mengalami peningkatan ketebalan, tekstur, dan elastisitasnya sampai 70%, massa otot dan kekuatannya meningkat 80%, dan lemak tubuh hilang sampai 72%²⁸.

F. KOLAGEN DAN FIBROBLAS

Kolagen adalah merupakan protein yang menjadi komponen utama dari serabut-serabut jaringan ikat. Dalam tubuh manusia, serabut kolagen merupakan komponen terbesar dari matrik ekstraseluler dengan berat lebih dari 70% dari berat kering dermis. Dengan mikroskop elektron tampak bahwa kolagen tersusun oleh fibril dan myofibril atau tropokolagen yang membentuk pita-pita yang bersilangan²⁹.

Kolagen tipe I, merupakan purwarupa (*prototype*) komponen utama penyusun kolagen, adalah kolagen terbanyak di dermis dan jaringan ikat lain membentuk 80-85% kolagen dermal total. Tersusun dari 3 rantai polipeptida yang teranyam membentuk untaian rangkap tiga (tiga helix), dan masing-masing rantai mempunyai berat molekul sekitar 94000 Dalton. Ketiga rantai polipeptida ini disebut juga rantai α yang tersusun lebih dari 1000 asam amino, di mana sepertiganya merupakan asam amino glisin. Glisin selalu terletak pada posisi ke-3, sehingga rumusan rantai α dapat ditulis sebagai : (X-Y-Gli). Posisi X dan Y dapat diisi oleh salah satu asam amino, tetapi yang sering posisi X diisi oleh prolin dan Y diisi oleh hidroksiprolin. Posisi X kadang-kadang diisi oleh lisin

Gli). Posisi X dan Y dapat diisi oleh salah satu asam amino, tetapi yang sering posisi X diisi oleh prolin dan Y diisi oleh hidroksiprolin. Posisi X kadang-kadang diisi oleh lisin dan posisi Y oleh hidroksilisin. Asam amino lisin dan hidroksilisin dalam rantai α yang berguna untuk pembentukan untaian rangkap tiga, serta menjaga kestabilan rantai α melalui ikatan kovalen. Hidroksiprolin berguna untuk mempertahankan kestabilan untaian rangkap tiga pada temperatur fisiologis. Rantai ini dibagi menjadi rantai α_1 dan rantai α_2 berdasarkan komposisi dari asam amino penyusun rantai α ²⁹.

Kolagen tipe III, merupakan bentuk kolagen yang berbeda secara genetik, terutama dijumpai di jaringan saluran pencernaan dan pembuluh darah, jumlah sekitar 10% dari kolagen total dermis manusia dewasa. Pada awalnya disebut sebagai kolagen fetus karena terutama dijumpai pada kulit manusia selama fase embrionik. Namun proliferasi fibroblas tipe I meningkat selama periode paska kelahiran awal sampai rasio kolagen tipe I : III pada kulit manusia dewasa adalah 8:1. Kolagen tipe III terdiri dari 3 rantai α, α_1 (III) dibedakan dengan rantai kolagen tipe I karena kandungan hidroksiprolin dan glisin yang relatif lebih tinggi dan adanya sisa sistein ²⁹.

Sintesis kolagen terutama dilakukan oleh fibroblas, karena sifat kolagen yang tidak larut dalam air, dapat di pastikan bahwa kolagen tidak langsung disintesis dalam sel fibroblas. Penelitian lebih lanjut membuktikan bahwa kolagen disintesis dalam retikulum endoplasmik kasar dalam bentuk prokolagen. Prokolagen disintesis dari prekusornya berupa pro rantai α yang disintesis dalam ribosom fibroblas ²⁹.

Sintesis pro rantai α didasarkan pada urutan kode genetik dalam mRNA. Dengan teknologi biomolekuler, diketahui bahwa urutan nukleotida dari gena kolagen dalam RNA yang disalin oleh mRNA, terdiri dari *exon* yaitu kodon yang menentukan urutan

asam amino dalam kolagen, dan *intron* yang merupakan urutan basa non kodon yang tidak menentukan urutan asam amino²⁹.

Peptida akhir rantai juga akan membuat molekul prokolagen yang larut dan mencegah terbentuknya kolagen fibril yang prematur, serta membuat prokolagen siap untuk dikeluarkan ke ruang ekstra seluler. Setelah prokolagen terbentuk, prokolagen dibawa ke golgi dalam bentuk vesikel-vesikel. Dari golgi, vesikel-vesikel tersebut akan disekresikan melalui mikrotubuli dan mikrofilamen menuju ke permukaan sel yang kemudian berada di ruang ekstrasel²⁹.

Dalam ruangan ekstraseluler, peptida-peptida akhir dari prokolagen akan dipotong oleh prokolagen peptidase, sehingga terjadi tropokolagen. Yang tidak larut dan akan menjadi fibril-fibril kolagen dan serabut kolagen. Daya regang kulit tidak akan terjadi bila ikatan silang melalui ikatan kovalen dalam serabut kolagen tidak ada²⁹.

G. BIAKAN FIBROBLAS

Banyak penelitian *in vitro* yang telah menjadi prosedur rutin pada beberapa laboratorium dengan menggunakan kulit atau sel kulit yang diisolasi dari bagian tubuh. Kulit tersusun dari struktur yang sangat kompleks dari beberapa tipe sel, yang dapat dibiakkan secara laboratoris termasuk sel fibroblas, sel keratinosit, sel melanosit, dan sel endotel. Penelitian menggunakan sel fibroblas manusia telah dipelopori oleh Hayflicks pada tahun 1960, yang dipakai sebagai model penelitian gerontologi secara *in vitro* pada biakan terbatas, karena sifatnya selama kultur dapat dianggap sama dengan penuaan pada tingkat makroskopik³⁰. Pada penelitian ini fibroblas merupakan model yang paling baik,

karena disamping memiliki perangkat genetik (DNA) yang menjadi target penelitian, juga mudah dan lebih stabil dalam biakan, di samping memiliki *life span* yang panjang³⁰.

Untuk melihat adanya efek penuaan secara *in vitro* sebagai model adalah sel fibroblas di samping mempunyai perangkat genetik, sel fibroblas inilah yang memproduksi kolagen. Biakan sel yang diperoleh secara langsung dari bahan kulit yang dapat tumbuh di dalam medium biakan disebut sebagai biakan primer. Pemakaian sel keratinosit pada penelitian *in vitro* mempunyai keterbatasan karena kemampuan pertumbuhan yang kurang, kecuali dengan penambahan *epidermal growth factor* dan *cholera toxin* yang dapat meningkatkan *life span* pada biakan. Berbeda dari keratinosit, fibroblas biasanya mudah tumbuh pada biakan serta dapat dilakukan subkultur dengan memindahkan fibroblas murni dari piring petri biakan jaringan primer, dipisahkan dan kemudian dimasukkan ke dalam piring petri baru yang berisi medium segar untuk memulai pertumbuhan lagi³¹. Sel-sel fibroblas di dalam biakan biasanya dipelihara dengan medium biakan cair yang mengandung berbagai asam amino, vitamin, serum, garam organik, glukosa untuk sumber energi, *buffer bicarbonate* untuk menjaga kestabilan pH 7,2. Kemudian kultur di masukkan dalam inkubator di jaga selalu pada suhu 37°C dan kadar CO₂ 5% untuk menjamin pertumbuhan optimal. Terdapat berbagai macam medium biakan jaringan yang telah tersedia saat ini. Media yang paling sering di gunakan baik untuk medium transport maupun untuk pembiakan fibroblas adalah DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*). Biasanya di tambahkan beberapa antibiotik yaitu penisilin, gentamisin, streptomisin, dan antijamur yaitu fungizon, serta *Fetal Bovin Serum* (FBS) atau *Fetal Calf Serum* (FCS) atau *New Born Calf Serum* (NbCF) untuk menjadi medium lengkap. Medium lengkap ini di gunakan sebagai makanan kultur yang

sebelumnya harus disterilkan dengan cara menyaring memakai filter 0,02 μ atau dengan alat sterilisator khusus dan dibuat pH 7,2. Kondisi lain pada biakan seperti lama inkubasi, suplemen terhadap medium, perlakuan, bergantung pada tujuan, kemampuan, dan pengalaman peneliti^{30,31}.

H. FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE (FPCL)

Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL) adalah model kontraksi kolagen secara *in vitro* dengan menggunakan kisi-kisi kolagen yang di ambil dari kolagen ekor tikus. Percobaan FPCL di gunakan untuk mempelajari pengaruh fibroblas terhadap kinerja kolagen matrik ekstraseluler. Pada FPCL, sel fibroblas berada dalam matriks kolagen secara tiga dimensi dimana dengan berjalannya waktu fibroblas akan mendapat perangsangan dari matrik kolagen disekitarnya melalui jalur signal tranduksi. Keberadaan asam amino sistein dalam kolagen melalui jalur signal tranduksi akan memberi pesan melewati membran sel yang kemudian akan diteruskan sampai ke nukleus sel fibroblas. Pesan akan di kembalikan dalam bentuk perintah ke mitokondria untuk memproduksi kolagen kemudian di sekresikan ke matrik ekstraseluler. Kolagen ini akan mereorganisasi kisi-kisi matrik kolagen yang ada di sekitarnya untuk berkontraksi bersama-sama. Kemampuan fibroblas untuk melakukan reorganisasi matriks ekstraseluler dari kisi-kisi kolagen ini yang kemudian dicatat dengan mengukur daerah “ *collagen lattice*” yang terbentuk secara serial dengan *Scion Image*³².

Pada percobaan dengan sinar UVB, FPCL fibroblas manusia normal akan berkontraksi sejalan dengan tingkat kerusakan sel fibroblas dalam mengorganisasi matriks ekstraseluler dari kisi-kisi kolagen. Terdapat penghambatan kontraksi FPCL yang

tergantung pada dosis UVB yang diberikan. Sedangkan kontrol yang tidak mengandung sel fibroblas tidak mengalami kontraksi. Sehingga disimpulkan bahwa terjadinya kontraksi FPCL disebabkan adanya interaksi antara fibroblas dengan serabut kolagen yang ada di sekitarnya³³.

Jumlah sel fibroblas di dalam gel kisi kolagen akan mempengaruhi kontraksi FPCL dan ketebalannya. *Lattice* akan menjadi bertambah tebal sesuai bertambahnya waktu dan penebalan ini berbanding lurus dengan jumlah sel. Sebaliknya, ternyata tidak ada hubungan antara konsentrasi kolagen dan ketebalan *lattice* yang terbentuk, sehingga kontraksi yang terjadi hanya oleh karena pengaruh keberadaan sel fibroblas. Shigenory dkk (1989), menemukan bahwa terdapat hubungan langsung antara kolagen kulit dan ketebalan dermis walaupun ketebalan kulit sendiri tidak dapat digunakan untuk mengukur kandungan kolagen kulit^{33,34}.

I. AGYROPHYLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION (AgNOR)

Pengecatan AgNOR adalah model pengecatan yang di gunakan untuk mengukur aktivitas proliferasi suatu sel. Crocker dkk, (1989) telah mengembangkan teknik ini secara intensif, bahwa *Nucleolar Organizer Region* (NOR) adalah lengkung DNA ribosomal yang menempati area khusus pada kromosom 13, 14, 15, 21, dan 22 yang diketahui sebagai tempat DNA ribosomal (rDNA). *NOR* mempunyai struktur nukleoprotein khas yang selama transkripsi bersifat asidik sehingga dapat diwarnai dengan perak. Dengan pewarnaan tersebut AgNOR dapat dilihat dengan mikroskop cahaya sebagai bintik-bintik hitam pada nukleus. Adanya bintik-bintik hitam di dalam nukleus dapat digunakan untuk pengukuran indek proliferasi sel fibroblas dengan

Kegunaan teknik AgNOR telah banyak dipakai dalam bidang dermatologi antara lain untuk evaluasi membedakan antara nevus displastik dan melanoma. Kesimpulan dari evaluasi tersebut adalah nilai AgNOR dapat digunakan untuk membedakan melanoma dan *borderline melanocytic naevi*. Selain itu kuantitas AgNOR juga mempunyai arti prognostik untuk melanoma maligna. Nilai AgNOR juga dapat digunakan untuk menilai penanda aktivitas dari sel-sel fibroblas^{36,37}.

Susilowati pada tahun 2004 telah menggunakan teknik pengecatan AgNOR ini untuk menilai efek anti proliferasi pada biakan jaringan keloid dengan uji coba triamsinolon asetonid dan 5-fluorourasil. Sehingga secara teoritis teknik ini dapat memiliki arti dalam menilai tingkat penghambatan proliferasi sel fibroblas oleh paparan UVB dan perangsangan proliferasi fibroblas oleh hormon genotropin³⁸.

J. GENOTROPIN®

Genotropin merupakan somatotropin yang dihasilkan dengan teknologi rekombinan DNA, yang mengandung 191 asam amino dimana susunannya identik dengan yang terdapat di dalam *human growth hormone* alaminya yang dihasilkan dari kelenjar pituitari manusia. Pemberian genotropin pada orang dewasa yang mengalami defisiensi *growth hormone* akan meningkatkan kadar IGF-1 serum dalam kadar normal dan memberikan perbaikan berupa peningkatan massa otot, massa kulit dengan meningkatnya ketebalan kolagen dermis, menurunkan massa lemak, memperbaiki energi dan vitalitas, meningkatkan metabolisme protein dan metabolisme lemak dengan mengurangi timbunan lemak dan meningkatkan asam lemak bebas dalam plasma³⁹.

meningkatkan metabolisme protein dan metabolisme lemak dengan mengurangi timbunan lemak dan meningkatkan asam lemak bebas dalam plasma³⁹.

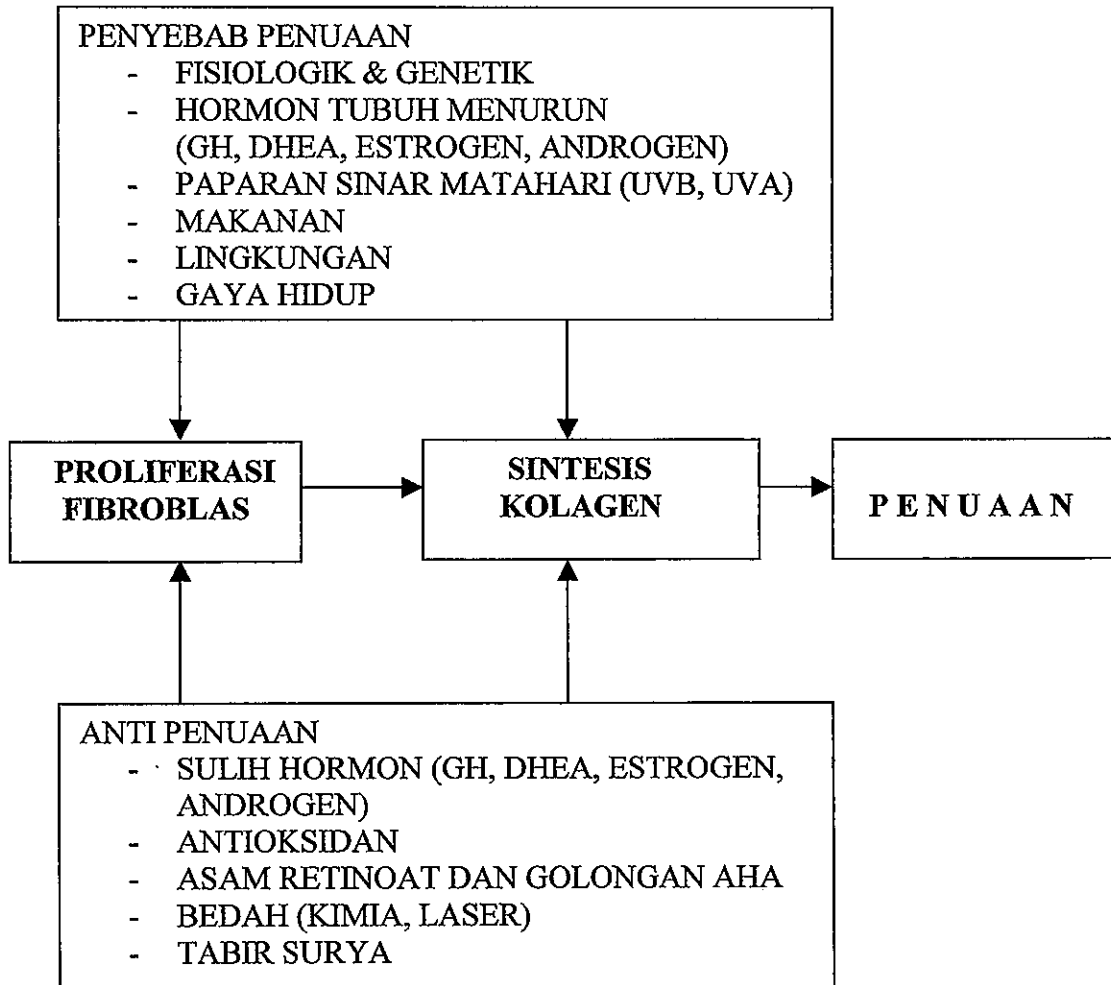
Dosis pemberian genotropin untuk orang dewasa dimulai dari 0,125 IU (0,04 mg) / kg BB/ minggu, secara bertahap ditingkatkan sesuai menurut keperluan pasien dengan dosis maksimum 0,25 IU (0,08mg)/kgBB/minggu. Besar dosis ini dimaksudkan untuk mengembalikan kadar *growth hormone* pada kondisi optimal. Kadar IGF-1 pada umur 20-30 tahun 150-100 μ IU/ml, pada usia 40-50 tahun 70-50 μ IU/ml, sedangkan pada usia 50-60 tahun 40-30 μ IU/ml. Untuk perlakuan pada penelitian ini dosis genotropin disesuaikan dengan kadar IGF-1 dalam plasma yang dibagi menjadi 3 kelompok^{39,40}.

K. SINAR ULTRAVIOLET B

Sinar ultraviolet B adalah bagian dari sinar matahari yang mempunyai panjang gelombang 290-320 nm. Sinar UVB karena memiliki energi foton yang lebih besar akan dapat secara langsung menyebabkan kerusakan DNA (*DNA damage*) melalui pembentukan *cylobutane pyrimidine dimmers* (CPD), melalui jalur reaksi sinyal transduksi sinar UVB menginduksi radikal bebas yang akan menyebabkan kerusakan eksudatif terhadap sel fibroblas, dan juga dapat menginduksi enzim proteinase MMP⁴¹. Brenneisten dkk (2001), melakukan penelitian tentang pengaruh sinar UVB terhadap kultur sel fibroblas manusia. Dengan tehnik ELISA, diukur nilai MMP, radikal bebas (OH⁻), dan CPD terhadap kultur fibroblas yang sudah mendapat paparan UVB dengan berbagai dosis penyinaran. Simpulan adalah pada dosis sinar UVB 30 mJ/cm² akan langsung menyebabkan kerusakan DNA dengan nilai kadar CPD paling tinggi, sedang pada dosis 20 mJ/cm² menginduksi peningkatan radikal bebas, dan pada dosis 10 mJ/cm²

menginduksi kadar MMP yang tinggi ⁴². Berdasarkan uraian dalam tinjauan pustaka, maka disusun kerangka teori sebagai berikut (gambar 1).

L. KERANGKA TEORI

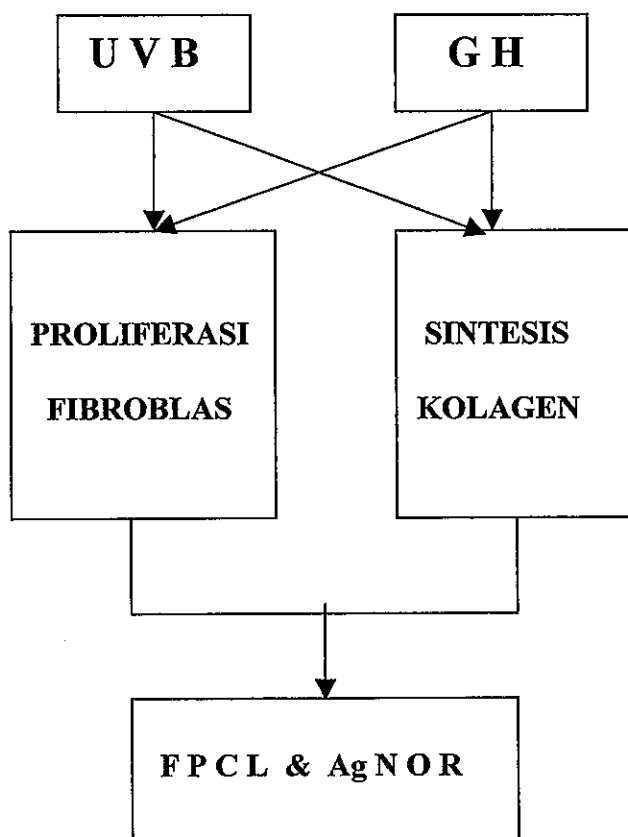


Gambar 1. Kerangka teori

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* terhadap biakan fibroblas dari jaringan kulit normal. Kepada subyek penelitian diberikan perlakuan paparan sinar UVB dalam berbagai dosis, hormon genotropin dalam berbagai dosis, serta kombinasi antara kedua perlakuan dalam berbagai dosis pula. Perlakuan ini untuk melihat kemampuan

proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen pada kontraksi FPCL dan AgNOR, dengan demikian faktor-faktor lain tidak dibahas. Berdasarkan uraian tersebut, maka disusun kerangka konsep sebagai berikut (gambar 2).

M. KERANGKA KONSEP



Gambar 2. Kerangka konsep

N. HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori diatas maka disusun hipotesis sebagai berikut :

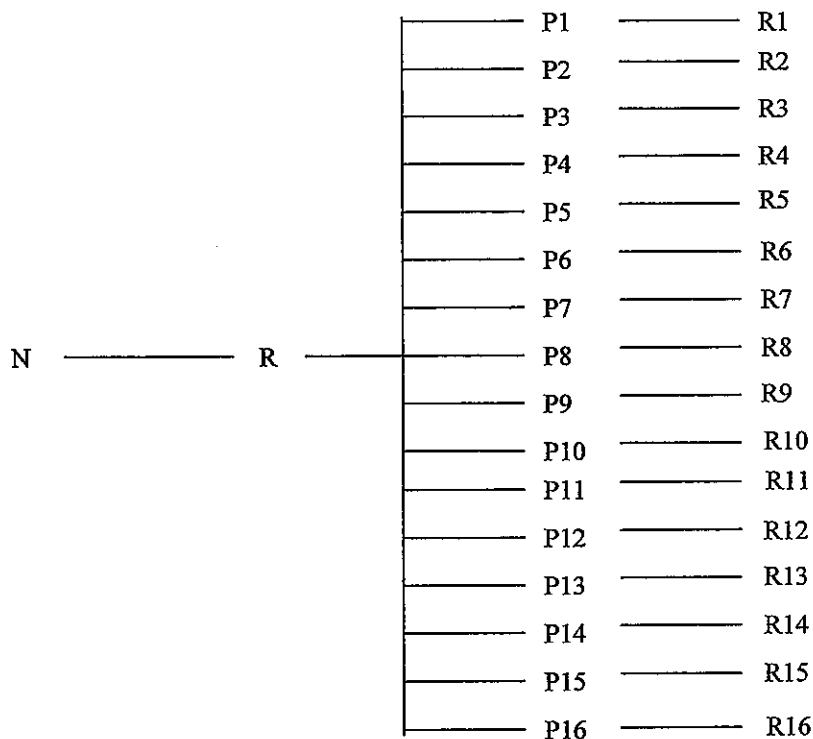
1. Ada perbedaan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan dengan berbagai dosis UVB saja dan GH saja atau kombinasi keduanya dengan kontrol.
2. Ada perbedaan sintesis kolagen pada biakan fibroblas dari jaringan kulit normal manusia yang diberi paparan berbagai dosis dengan UVB saja dan GH saja atau kombinasi keduanya dengan kontrol.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *Post test-only Control Group Design* menggunakan kultur sel dalam sumuran sebagai sampel unit penelitian. Sampel tersebut diberi perlakuan berupa paparan sinar ultra violet B (UVB) dosis 10 mJ/cm², 20 mJ/cm², 30 mJ/cm² dan hormon genotropin (GH), dengan dosis GH1=30 µIU/ml, GH2=50 µIU/ml, GH3=100 µIU/ml pada biakan fibroblas di dalam kisi-kisi kolagen pada FPCL dengan hasil keluaran adalah adanya proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen. Sel fibroblas berasal dari kultur jaringan kulit manusia sehat yang diambil dari bagian punggung seorang donor berusia 18 tahun .



Keterangan :

R : Randomisasi

P1 : FPCL dan AgNOR yang tidak dipapari UVB dan GH, selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 0 GH 0.

P2 : FPCL dan AgNOR yang dipapari GH 1, selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 0 GH 1.

P3 : FPCL dan AgNOR yang dipapari GH 2, selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 0 GH 2.

P4 : FPCL dan AgNOR yang dipapari GH 3, selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 0 GH 3.

P5 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 10 mJ/cm^2 , selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 10 GH 0.

P6 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 20 mJ/cm^2 , selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 20 GH 0.

P7 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 30 mJ/cm^2 , selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 30 GH 0.

P8 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 10 mJ/cm^2 , GH 1 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 10 GH1.

P9 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 10 mJ/cm^2 , GH 2 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 10 GH2.

P10 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 10 mJ/cm^2 , GH 3 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 10 GH3.

P11 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 20 mJ/cm², GH 1 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 20 GH1.

P12 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 20 mJ/cm², GH 2 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 20 GH2.

P13 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 20 mJ/cm², GH 3 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 20 GH3.

P14 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 30 mJ/cm², GH 1 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 30 GH1.

P15 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 30 mJ/cm², GH 2 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 30 GH2.

P16 : FPCL dan AgNOR yang dipapari UVB 30 mJ/cm², GH 3 selanjutnya disebut kelompok perlakuan UVB 30 GH3.

R1 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P1

R2 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P2

R3 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P3

R4 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P4

R5 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P5

R6 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P6

R7 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P7

R8 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P8

R9 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P9

R10 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P10

R12 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P12

R13 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P13

R14 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P14

R15 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P15

R16 : Pengamatan kontraksi FPCL dan jumlah AgNOR pada kelompok perlakuan P16

Masing-masing setiap perlakuan dilakukan secara triplo dan kemudian diambil nilai reratanya.

B. POPULASI DAN SAMPEL

Populasi penelitian ini adalah sel-sel fibroblas hasil panen dari kultur fibroblas jaringan kulit normal dalam pembiakan botol *falcon flask* yang berisi medium DMEM lengkap (DMEM, FCS 10%, Fungizone 0.1%, Gentamsin 0.2%). Sel fibroblas kemudian dimasukkan dalam sumuran kisi-kisi kolagen dari FPCL yang dimasukkan secara acak sederhana ke dalam 48 sumuran dalam jumlah yang sama 0.5 cc per sumuran. Dari 48 sumuran ini dibagi menjadi 16 kelompok perlakuan karena penelitian dilakukan secara triplo. Sumuran pertama sampai dengan ke tiga hanya diberi paparan dengan medium DMEM lengkap sebagai kontrol, sumuran ke empat sampai ke enam diberi paparan GH1, sumuran ke tujuh sampai ke sembilan diberi paparan GH2, sumuran ke sepuluh sampai ke dua belas diberi paparan GH3, dan seterusnya sampai sumuran ke empat puluh delapan dengan dosis UVB yang berbeda menurut kelompok perlakuannya. Kemudian diinkubasi selama semalam (*overnight*), sampai terbentuk gel. Setelah itu kemudian dipapari dengan genotropin lalu diinkubasi lagi *overnight*, kemudian dipapari dengan

UVB menurut kelompok perlakuannya. Setelah itu diberi medium DMEM lengkap diinkubasi lagi selama 24 jam kemudian diamati nilai kontraksinya FPCL dan indeks proliferasi dari AgNOR.

C. VARIABEL PENELITIAN

C.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perlakuan dengan kombinasi berbagai dosis antara UVB dan GH yang dapat dikategorikan menjadi 16 kelompok perlakuan sesuai dengan kelompok sampel.

C.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen yang diukur dengan nilai kontraksi FPCL dan proliferasi sel dengan pengecatan AgNOR.

D. BAHAN PENELITIAN

- Kulit normal sisa operasi yang diambil dari punggung seorang pasien laki-laki umur 18 tahun di poli Kulit dan Kelamin RS Dr. Sardjito.
- Alkohol 70 % dan betadin.
- Hormon Genotropin®.
- Medium kultur DMEM Sigma
- *Fetal Calf Serum* (FCS)
- *Newborn Calf Serum* (NbCF)

- Antibiotik penisilin-streptomisin, gentamisin.
- *Phosphat Buffer Saline* (PBS)
- Anti jamur Fungizone.
- Tripsin / *Etilen diamin tetraasetic acid* (EDTA) 0,1%.
- Kolagen (dari ekor tikus)
- Natrium hidroksida 0,1M
- Asam asetat 0,1%.
- Larutan *Turk*
- Cat perak nitrat

E. ALAT PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Sarung tangan steril.
2. Masker
3. Bak tahan karat (*stainless*) kecil steril.
4. Gunting steril, beberapa pinset bedah steril.
5. pH meter dan cairan teranya.
6. Tabung kultur Flask (*Falcon Flask Culture*) ukuran 40 ml dan 160 ml.
7. Rak tabung kecil dan besar.
8. Tabung *Falcon conical* 15 ml dan 50ml.
9. Tabung *petridish* 3 ml.
10. Filter ukuran 0.2 μ .
11. Piring petri steril 5 cm.
12. Lempeng biakan (*plate*) 24 sumuran.

13. Skalpel no.15 dengan tangkainya.
14. Pipet ukur 5ml,10 ml, 25 ml, pipet mikro, pipet *Pasteur* steril.
15. Inkubator CO2 merek Galaxy S.
16. *Laminary flow* merek ESCO.
17. Botol *Effendorf*.
18. *Yellow tip, blue tip, white tip*.
19. Botol *Schoot Duran* tutup biru 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.
20. Gelas beker dan gelas ukur.
21. Tabung *Erlemeyer* 25 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.
22. *Refrigerated centrifuge* merek Universal 32, Hetticht Centrifugen.
23. *Inverted microscope* merek EUROMEX
24. Kamera digital OLYMPUS 5 megapixel .
25. Sumber sinar UVB broad band merek PAST-SUN B buatan LIPI.

F. TEMPAT DAN LAMA PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Universitas Gajah Mada Yogyakarta selama kurang lebih 3 bulan.

G. DEFINISI OPERASIONAL

- **Perlakuan** : adalah memberikan perlakuan kultur sel fibroblas di dalam sumuran dengan paparan UVB dan GH dalam berbagai dosis dan kombinasi kedua dosis yang dikategorikan menjadi 16 kelompok, dan dilakukan secara triplo:

1. Kosong (hanya diberi medium lengkap).
2. GH 1
3. GH 2
4. GH 3
5. UVB 10 mJ/cm².
6. UVB 20 mJ/cm²
7. UVB 30 mJ/cm²
8. UVB 10 mJ/cm² + GH 1
9. UVB 10 mJ/cm² + GH 2
10. UVB 10 mJ/cm² + GH 3
11. UVB 20 mJ/cm² + GH 1
12. UVB 20 mJ/cm² + GH 2
13. UVB 20 mJ/cm² + GH 3
14. UVB 30 mJ/cm² + GH 1
15. UVB 30 mJ/cm² + GH 2
16. UVB 30 mJ/cm² + GH 3

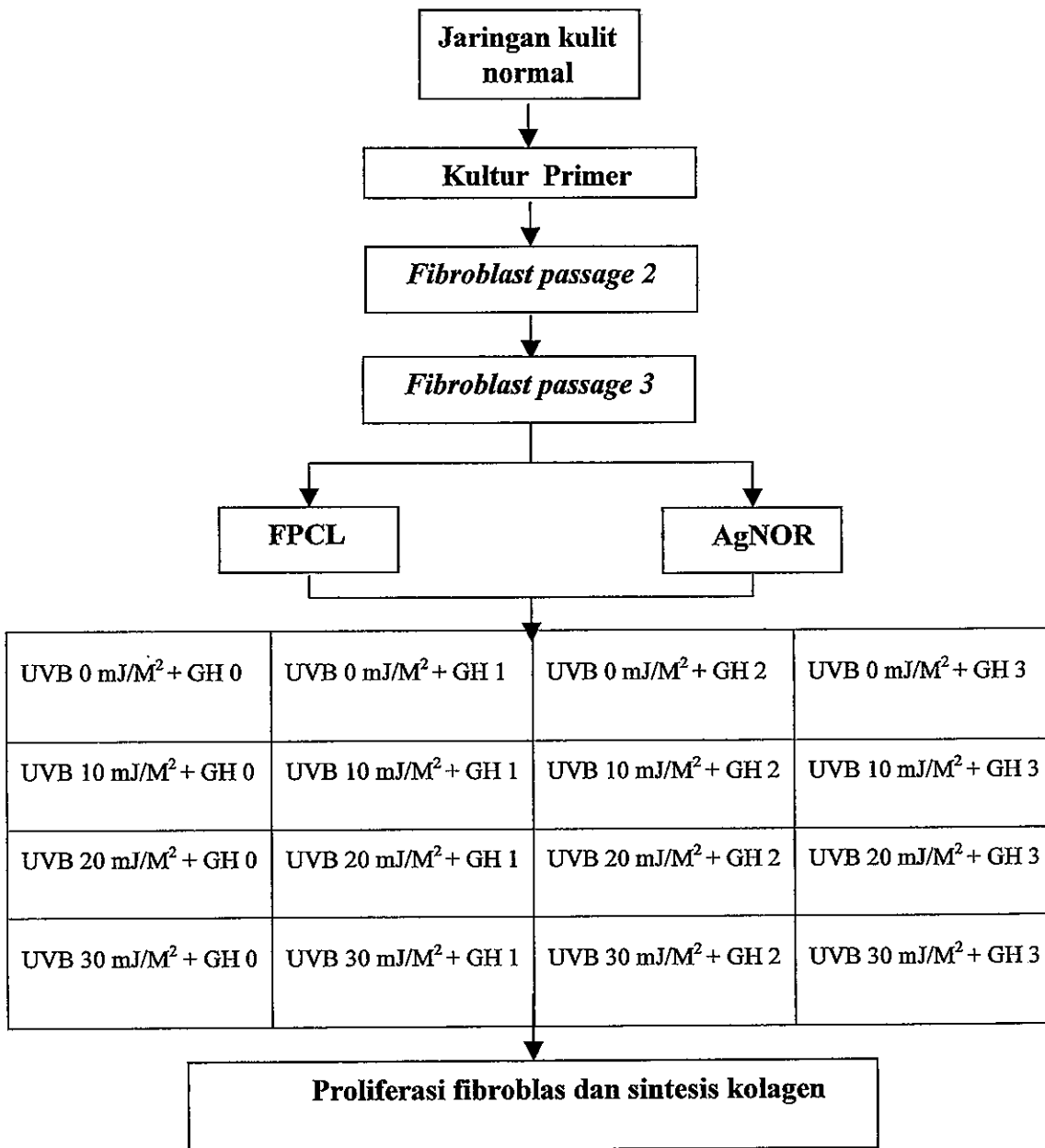
- FPCL : *Fibroblast Populated Collagen Lattice*,

Suatu model kontraksi kolagen secara *in vitro*. Dimana fibroblas berada dalam kisi-kisi matriks kolagen secara tiga dimensi dan dengan berjalannya waktu akan terjadi kontraksi, dimana kemampuan kontraksi dinilai dengan *Scion Image*, dan dinyatakan dengan prosentase (%).

- AgNOR : *Agyrophylic Organizer Region*.

Suatu model pengecatan untuk mengukur indek proliferasi sel dengan menghitung rerata bintik hitam dalam seratus nukleus. Jumlah dan ukuran berhubungan dengan aktivitas inti sel fibroblas yang menunjukkan aktivitas proliferasi suatu sel yang dinyatakan dengan indek proliferasi satuan dalam jumlah prosentase (%).

H. ALUR PENELITIAN



I. PENYIAPAN JARINGAN DONOR DAN KULTUR :

1. Penyiapan jaringan donor

Alat yang disiapkan adalah sarung tangan steril, masker, gunting steril, 2 buah pinset, 5 tabung *Nunc conical* 50 ml, pipet ukur, pipet *Pasteur*. Jaringan dari donor kulit normal sisa operasi diambil dipotong kira-kira 1x1cm sebanyak dua buah, kemudian dimasukkan kedalam tabung I yang berisi betadin 10 ml selama 30 detik untuk sterilisasi jaringan, kemudian diambil di masukkan tabung II yang berisi PBS 10 ml dan antibiotik selama 30 detik sambil digoyang-goyang, kemudian jaringan diambil di masukkan ke tabung III yang berisi PBS 10 ml dan antibiotik dikocok sampai sisa betadin dan darah bersih, kemudian diambil dimasukkan ke tabung IV yang berisi alkohol 70% 10 ml selama 30 detik sambil dikocok, kemudian dengan pinset kedua jaringan diambil dimasukkan ke tabung V yang berisi PBS dan antibiotik digoyang selama 30 detik kemudian dipindah ke tabung yang berisi medium DMEM lengkap yang sudah disterilkan kemudian tabung ini dimasukkan dalam termos berisi es.

2. Pembuatan kultur primer / passage 1

Alat dan bahan yang disiapkan: 2 buah piring petri steril, pinset bedah, gunting, skapel no.15 dengan tangkainya, tabung *Falcon conical* 15 ml, *petridish* 3 buah, *cover glass*, medium DMEM lengkap steril (DMEM + FCS 10 % + Fungizone 0,1% +gentamicin 0,2 %). Jaringan dari medium transport diambil dengan pinset di masukkan ke dalam petri 1 yang berisi PBS untuk dicuci, kemudian jaringan di pindah ke petri 2, jaringan dipotong diambil bagian dermis kemudian dermis dipotong-potong kecil sekitar 1 mm. Potongan-potongan kecil ini sebanyak 5-7 potong dimasukkan dalam *petridish* lalu ditekan sampai menempel di dasar

kemudian ditutup dengan *cover glass* lalu digenangi dengan medium DMEM lengkap sebanyak 2cc, tabung ditutup kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%, setiap 2 hari sekali medium diganti baru. Kultur dibiarkan tumbuh kira-kira selama 3-4 minggu sampai terdapat pertumbuhan konfluen penuh di dasar tabung.

3. Pembuatan kultur sekunder / passage 2,

Alat dan bahan yang disiapkan tabung *falcon conical* 15 ml, tabung *flask*, pinset steril, medium DMEM, dan PBS. Kultur fibroblas primer yang berada dalam *petridish*, mediumnya disedot kemudian dicuci dengan PBS, kemudian PBS disedot sampai bersih. Jaringan kultur di dasar tabung di lakukan tripsinasi dengan tripsin 0,1% 1cc dibiarkan selama 10 menit, di tambah medium sebanyak 4 ml untuk menghentikan kerja tripsin, lalu suspensi ini dimasukkan ke dalam tabung *falcon conical* kemudian disentrifus 6000 rpm, selama 10 menit. Supernatan dibuang, sedimen endapan diberi medium 3 ml kemudian disedot di pindahkan ke dalam tabung *flask* dan diberi medium DMEM lengkap lalu di inkubasi lagi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%. Medium diganti setiap 2 hari, dan kultur dibiarkan tumbuh sampai ada pertumbuhan konfluen di dasar tabung kira-kira selama 2 minggu.

4. Pembuatan kultur perlakuan / passage 3,

Alat dan bahan lempeng plate 24 sumuran, tabung *falcon conical* 50 ml, *Refrigerated centrifuge*, PBS, tripsin 0,1%, medium DMEM lengkap. Kultur dari passage 2, mediumnya disedot kemudian dicuci dengan PBS dilakukan 2 kali, lalu di tripsinasi dengan tripsin 0,1% selama 5-10 menit. Kerja tripsin dihentikan dengan pemberian medium DMEM, suspensi sel yang terbentuk dipindah ke tabung *falcon conical*

untuk dipusingkan selama 10 menit pada 6000 rpm, supernatan dibuang endapan sel kemudian disuspensikan dengan menambah medium DMEM 5 ml. Dari suspensi sel ini diambil dengan pipet mikro sebanyak 10 µl ditambah larutan *Turk* 90 µl kemudian dihitung pada bilik hitung hemositometer dengan menggunakan mikroskop *inverted* untuk menghitung jumlah sel fibroblas. Kemudian dari suspensi sel ini 0.5-0,75 ml akan dicampurkan dengan kolagen ekor tikus untuk membuat FPCL. FPCL dimasukkan ke setiap sumuran masing-masing 0,5 ml dalam lempeng 24 sumuran sebanyak 48 sumuran yang dibagi menjadi 16 kelompok perlakuan. Setiap sumuran berisi fibroblas sebanyak 10^5 sel dan dipelihara dengan memberikan medium DMEM lengkap dalam inkubator. Percobaan dilakukan secara triplo.

J. PEMBUATAN *FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE* (FPCL)

- Menyiapkan ekor buntut tikus yang telah dibuang kulitnya kemudian di rendam betadin 10 menit.
- Tendon ekor tikus diambil dengan menarik, lalu direndam alkohol 70% selama 20 menit dalam kulkas, kemudian di campur dengan asam asetat 0,1 %, 1 gr tendon /40 ml asam asetat dibiarkan dalam kulkas selama 2 hari, kemudian di sentrifuse dingin suhu 4°C selama 60 menit, 10000 rpm, supernatan disimpan dalam kulkas dan siap digunakan sebagai gel kolagen.
- Membuat FPCL sebanyak 25 ml terdiri dari (DMEM 2x 6,22 ml, NaOH 2,5 ml, FCS 2,5 ml, kolagen 7,5 ml, sel 0,5-0,75 ml).
- Setelah terbentuk suspensi diambil dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing 0,5 ml harus dilakukan dalam kondisi dingin agar tidak membeku. Kemudian

diberi medium DMEM lengkap inkubasi selama 2 jam atau sampai kolagen menjadi padat (tidak goyang) kemudian siap untuk dilakukan perlakuan.

- Kemudian diberikan perlakuan dengan memberikan GH dengan masing-masing dosis menurut kelompok perlakuan lalu ditambah DMEM diinkubasi selama semalam (*overnight*).
- Kemudian diberikan perlakuan paparan dengan UVB menurut dosis dan kelompok perlakuannya, selanjutnya diberi medium dan diinkubasi lagi selama 24 jam.
- Setelah 24 jam dinilai kontraksi kolagen pada *FPCL* dengan pembuatan foto digital jarak 3 cm dan tegak lurus, dari data foto kemudian dianalisis dengan komputer menggunakan program *Scion Image*.

K. CARA MENGUKUR DENGAN *SCION IMAGE*

- Untuk masing-masing sumuran dilakukan pembuatan foto dengan kamera digital dengan jarak 3 cm, sudut tegak lurus 90° dengan pencahayaan sama (lampu *blitz* kamera dimatikan) dari lampu ruangan.
- Data foto dipindahkan ke komputer dan kemudian dianalisis dengan *Scion Image*.
- Dengan mengukur kolagen batas terluar (A) dan batas kontraksi terdalam (B) dapat dihitung nilai kontraksi dengan menghitung $(A-B) : A$.
- Semakin banyak sel fibroblas yang hidup dan terstimulasi oleh GH dalam kisi-kisi kolagen (*collagen lattice*) maka akan semakin besar nilai kontraksinya.
- Sebaliknya semakin banyak sel fibroblas mati dalam kisi-kisi kolagen karena pengaruh UVB maka akan semakin kecil nilai kontraksi.

- Pada sumuran yang hanya berisi kolagen dan tidak ditambahkan sel fibroblas tidak mengalami kontraksi.

L. MEMBUAT AgNOR DAN MENGHITUNG INDEK PROLIFERASI

- Menyiapkan sel, dengan mengambil sel dari botol flash di tripsinasi, kemudian disentrifus lalu dihitung konsentrasi sel, membuat solutio sel dengan konsentrasi jumlah sel 10^5 /ml.
- Menyiapkan petridish yang di dalamnya dimasukkan dek glas, kemudian ditengah dek glas ditetesi solutio sel sebanyak 25 μ l ke setiap petridish, lalu dibiarkan selama 3 jam di dalam inkubator.
- Setelah 3 jam sel diberi medium saja dan medium yang mengandung GH menurut kelompok perlakuan, dimasukkan lagi ke inkubator selama semalam.
- Setelah semalam semua medium dalam petridish disedot diganti PBS lalu di lakukan paparan UVB ke petridish menurut kelompok perlakuannya, dengan cara petridish diletakkan di bawah sumber sinar UVB, selanjutnya PBS disedot dan diganti medium biasa lalu diinkubasi lagi selama semalam.
- Kemudian medium disedot keluar diganti PBS untuk mencuci lalu masing-masing dek glas difiksasi dengan meneteskan methanol dingin ke dalam petridish dan di biarkan selama 30 menit, selanjutnya dicuci dengan air diulangi 3 kali.
- Dilakukan pengecatan dengan meneteskan perak nitrat ke dalam petridish di atas dek glas yang dilakukan dalam ruang gelap dan dibiarkan selama 45 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dek glas diambil dari petridish dengan

pinset dan direhidrasi dengan memasukkan ke dalam etanol, kemudian di keringkan diletakkan di atas kertas tisu.

- Pada dek glas di teteskan balsam *Canada* dan *xylol* kemudian dilekatkan pada obyek glas dengan cara pada permukaan dimana sel dilekatkan, diletakkan di bawah tunggu sampai kering kemudian diamati dengan mikroskop.
- Hitung jumlah NOR dalam tiap inti dengan menghitung bintik hitam dalam 100 sel untuk mendapatkan reratanya.
- Hasil rerata ini yang dimaksud dengan indek proliferasi.
- Semakin banyak sel fibroblas yang hidup dan terstimulasi oleh GH maka indeks proliferasi semakin tinggi.
- Semakin banyak sel fibroblas yang mati karena pengaruh UVB maka indek proliferasi semakin rendah.
- Pada pengecatan kolagen dari sumuran yang tidak ditambahi sel maka tidak ditemukan adanya bintik hitam/ NOR.

L. ANALISIS DATA

Data dari hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data penelitian dari masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini diasumsikan terdistribusi secara normal sehingga dilakukan analisis parametrik uji ANOVA dan *independent t test* untuk melihat adanya perbedaan dari kelompok-kelompok perlakuan. Besarnya rerata perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Post Hoc Tukey* oleh karena varian data homogen. Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 10 .01 for Windows*.

Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0.05$.

M. KETERBATASAN PENELITIAN

Kurangnya pengalaman peneliti dalam hal ilmu biologi molekuler sehingga meningkatkan resiko kontaminasi dan kematian sel dalam kultur. Kultur sel fibroblas dari jaringan kulit normal harus dipelihara hati-hati dengan perlakuan yang serba steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi dan kematian sel. Jika terjadi kontaminasi pada kultur harus segera dilakukan dekontaminasi dengan cara dicuci dengan medium yang mengandung antibiotik dan anti jamur kemudian dilanjutkan dalam medium lengkap, jika tetap terinfeksi segera dibuang, dan ganti dengan mulai kultur baru.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan laboratorium yang semula akan mengukur dua variabel dependen, yaitu proliferasi fibroblas dalam bentuk indeks proliferasi pada AgNOR dan sintesis kolagen yang diukur dalam bentuk persentase kontraksi kolagen dengan model FPCL, akhirnya yang berhasil diperiksa hanya variabel sintesis kolagen. Proliferasi fibroblas dalam bentuk indeks proliferasi hanya berhasil pada kelompok AgNOR kontrol (tanpa paparan UVB dan genotropin) dan kelompok AgNOR tanpa paparan sinar UVB namun mendapat paparan genotropin yang meningkat, yaitu GH1, GH2, GH3. Pada kelompok AgNOR yang mendapat perlakuan paparan UVB dengan dosis UVB 10 mJ/cm², 20 mJ/cm², dan 30 mJ/cm², tidak berhasil dilakukan penghitungan proliferasi fibroblas karena sel-sel fibroblas mengalami lisis dan inti sel pecah. Sehingga pengecatan AgNOR terhadap inti sel tidak dapat diidentifikasi sebagai NOR yang harus dihitung.

A. Sintesis kolagen yang diukur berdasarkan persentase kontraksi kolagen

Rerata kontraksi kolagen dari 16 kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 1. Rerata kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok yang mendapat paparan GH3 tetapi tidak mendapat paparan UVB (45,68%), sedangkan rerata persentase kontraksi kolagen terendah ada pada kelompok yang mendapat paparan UVB 30 mJ/cm² tetapi tidak mendapat paparan GH (10,7%). Hasil ini sesuai dengan teori bahwa persentase kontraksi kolagen akan mencapai tingkat tertinggi pada dosis GH terbesar (GH3) tanpa paparan UVB sama sekali, dan akan mencapai persentase terendah pada kelompok dengan dosis paparan UVB terbesar (30 mJ/cm²) tanpa paparan GH. Pada kelompok

kontrol (tidak mendapat paparan UVB maupun GH), rerata persentase kontraksi kolagen adalah 34,16%.

Tabel 1. Rerata persentase kontraksi kolagen dari 16 kelompok perlakuan.

	N	Min	Max	Rerata	Simpang Baku
Kontrol	3	31,48	37,23	24,16	2,89
GH1	3	35,48	41,23	38,04	3,33
GH2	3	38,12	50,96	44,37	6,47
GH3	3	44,13	48,29	45,69	2,28
UVB1	3	16,79	29,70	23,13	6,45
UVB2	3	17,65	22,07	19,82	2,21
UVB3	3	7,20	15,06	10,75	3,98
UVB10 GH1	3	24,95	29,89	27,63	2,49
UVB10 GH2	3	28,32	37,25	31,59	4,92
UVB10 GH3	3	28,46	40,84	34,09	6,27
UVB20 GH1	3	22,24	29,50	25,97	3,63
UVB20 GH2	3	25,67	36,81	30,74	5,64
UVB20 GH3	3	30,87	37,90	33,63	3,74
UVB30 GH1	3	19,32	29,70	24,18	5,22
UVB30 GH2	3	25,70	38,40	30,08	7,20
UVB30 GH3	3	30,41	34,57	32,39	2,08

Untuk memenuhi tujuan khusus pertama dari penelitian ini, yaitu membuktikan ada tidaknya pengaruh paparan UVB terhadap sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang mendapat paparan UVB, maka dilakukan uji ANOVA. Rerata persentase kontraksi kolagen kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 10 mJ/cm² tanpa paparan GH, lebih tinggi dibandingkan kelompok dengan paparan UVB dosis 20 mJ/cm² tanpa paparan GH maupun kelompok dengan paparan UVB dosis 30 mJ/cm² tanpa paparan GH sama sekali. Namun bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, rerata persentase kontraksi kolagen kelompok perlakuan UVB dosis 10 mJ/cm² tersebut, masih lebih rendah. Untuk mengetahui hasil rerata kontraksi kolagen pada kelompok paparan UVB dengan berbagai dosis dapat dilihat di tabel 2.

Tabel 2. Rerata kontraksi kolagen dengan paparan UVB saja dan tanpa paparan GH namun dengan dosis paparan UVB yang semakin tinggi.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
UVB1	3	23,1315	6,4561	16,79	29,70
UVB2	3	19,8225	2,2105	17,65	22,07
UVB3	3	10,7542	3,9844	7,20	15,06
Total	12	21,9689	2,7292	7,20	37,23

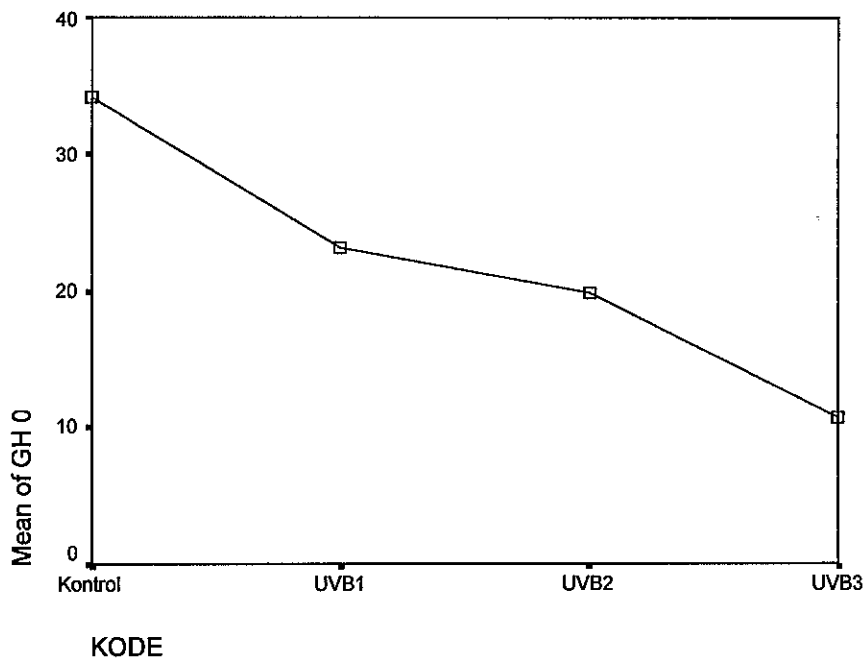
F=15,845, p=0,001

Dari tabel 2 diatas, tampak ada pengaruh paparan berbagai dosis UVB terhadap sintesis kolagen yang diukur berdasarkan persentase kontraksi kolagen. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase kontraksi kolagen di antara kelompok kontrol dengan ke tiga kelompok lainnya yang tidak mendapat paparan GH tetapi mendapat paparan UVB dengan dosis yang semakin besar F=15,845, p=0,001 dapat dilihat pada lampiran1. Semakin besar paparan dosis UVB yang diberikan, semakin kecil persentase kontraksi kolagen, hal ini membuktikan bahwa paparan sinar UVB dengan dosis yang semakin besar, akan mengganggu proses sintesis kolagen.

Untuk mengetahui, pada kelompok manakah perbedaan itu terjadi secara bermakna, maka selanjutnya diikuti dengan *post hoc test Tukey HSD*. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan UVB dosis 10 mJ/cm² tanpa GH (p = 0,049). Perbedaan rerata persentase kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan UVB dengan dosis lebih besar (20 mJ/cm² dan 30 mJ/cm²), menunjukkan perbedaan rerata yang semakin besar. Antara kelompok kontrol dengan kelompok mendapat paparan UVB 20 mJ/cm² terdapat perbedaan rerata kontraksi

kolagen sebesar 14,3447% ($p=0,013$), sedang dengan dosis 30 mJ/cm^2 sebesar 23,4130% ($p = 0,001$). Sementara kelompok perlakuan lainnya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik. Hasil selengkapnya *post hoc test Tukey HSD* dapat di lihat pada lampiran 2.

Grafik penurunan persentase kontraksi kolagen dari kelompok kontrol sampai kepada kelompok tanpa paparan GH namun dosis sinar UVB yang semakin membesar dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Penurunan kontraksi kolagen pada penambahan dosis paparan UVB

Hasil ini menunjukkan bahwa perbedaan kontraksi kolagen berbeda bermakna saat pemberian dosis paparan UVB sebesar 10 mJ/cm^2 , dan semakin berbeda bermakna pada dosis paparan UVB yang diperbesar. Hasil ini sesuai dengan teori bahwa UVB akan menyebabkan kerusakan kolagen baik dengan merangsang pembentukan enzim MMP

yang meningkat ataupun melalui kerusakan dan kematian sel fibroblas melalui kerusakan oksidatif maupun kerusakan langsung pada DNA (*DNA damage*).

Untuk memenuhi tujuan khusus kedua dari penelitian ini, yaitu membuktikan ada tidaknya pengaruh genotropin terhadap sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia yang mendapat paparan genotropin, maka dilakukan uji ANOVA. Rerata persentase kontraksi kolagen pada paparan genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB sama sekali, lebih tinggi dibandingkan kelompok dengan genotropin dosis GH2 tanpa paparan UVB maupun kelompok dengan genotropin dosis GH1 tanpa paparan UVB. Untuk mengetahui hasil selengkapnya rerata kontraksi kolagen pada berbagai macam dosis pemberian genotropin dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rerata kontraksi kolagen kelompok kontrol tanpa paparan UVB namun dengan dosis paparan genotropin yang semakin tinggi.

	N	Rerata	Simpang Baku	Manimum	Maximum
GH0	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
GH1	3	38,0442	3,3303	35,04	41,63
GH2	3	45,6867	6,4275	38,11	50,96
GH3	3	45,6867	2,2677	44,13	48,96
Total	12	40,5669	5,9986	31,47	50,96

F=5,339, p= 0,026

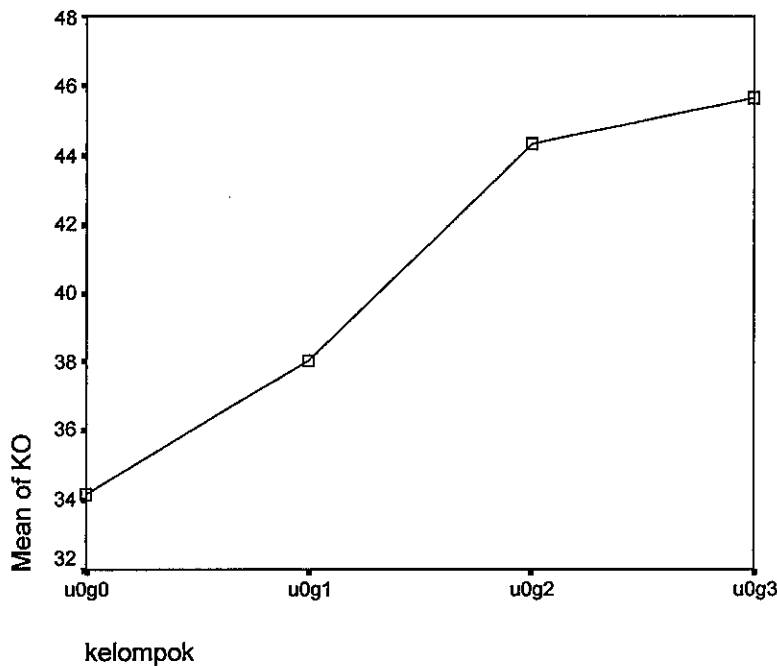
Hasil uji ANOVA dari tabel 3 tersebut, ternyata berhasil membuktikan bahwa memang ada pengaruh paparan berbagai dosis genotropin terhadap sintesis kolagen yang diukur berdasarkan persentase kontraksi kolagen. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase kontraksi kolagen di antara kelompok kontrol dengan ke tiga kelompok lainnya yang tanpa paparan UVB namun mendapat paparan genotropin dengan dosis yang semakin diperbesar (F=5,339, p=0,026). Semakin besar dosis genotropin yang

diberikan, semakin besar persentase kontraksi kolagen, hal ini membuktikan bahwa paparan genotropin dengan dosis yang semakin besar, akan meningkatkan proses sintesis kolagen dapat di lihat pada lampiran 3.

Untuk mengetahui, pada kelompok manakah perbedaan itu terjadi secara bermakna, maka selanjutnya diikuti dengan *post hoc test Tukey HSD*. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat paparan genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB. Perbedaan rerata persentase kontraksi kolagen sebesar 11,52% menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,034$). Dengan demikian sintesis kolagen kelompok yang mendapat paparan genotropin dosis GH3, lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol. Demikian pula sintesis kolagen kelompok yang diberi genotropin dosis GH3 juga sedikit lebih baik dibandingkan kelompok paparan genotropin dosis GH2 (berbeda sebesar 1,317%) maupun kelompok paparan genotropin dosis GH1 (berbeda sebesar 7,642%). Namun perbedaan rerata kontraksi kolagen diantara kelompok-kelompok perlakuan lainnya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik. Kontraksi kolagen pada kelompok paparan genotropin GH2 dan kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna $p=0,060$. Hasil selengkapnya *post hoc test Tukey HSD* dapat di lihat pada lampiran 4.

Grafik peningkatan persentase kontraksi kolagen dari kelompok kontrol sampai kepada kelompok tanpa paparan UVB namun dengan dosis genotropin yang semakin diperbesar dapat dilihat pada gambar 4. Dari gambar 4 terlihat jelas bahwa peningkatan dosis genotropin dua kali lipat, dari GH2 menjadi GH3, hanya mengakibatkan peningkatan sintesis kolagen yang relatif sedikit. Hal ini bisa dilihat dari kenaikan

kontraksi kolagen yang hanya sebesar 1,317%. Namun kenaikan dosis genotropin dari GH1 menjadi GH2, justru memperlihatkan kenaikan kontraksi kolagen yang lebih besar, yaitu dari yang semula 38,044% pada dosis GH1, meningkat menjadi 44,369% pada dosis GH2 (ada kenaikan 7,642%).



Gambar 4. Peningkatan kontraksi kolagen akibat penambahan dosis genotropin yang semakin tinggi.

Untuk memenuhi tujuan khusus ketiga dari penelitian ini, yaitu membuktikan adanya perbedaan sintesis kolagen antara biakan fibroblas jaringan kulit yang mendapat paparan kombinasi genotropin dan UVB pada biakan fibroblas sebagai kontrol, maka dilakukan uji ANOVA.

Uji ANOVA yang dilakukan adalah antara kontraksi kolagen kelompok kontrol (P1) dengan kelompok perlakuan P8, P11, P14 (dosis genotropin tetap yaitu GH1 namun dengan dosis paparan UVB yang berbeda-beda); kelompok kontrol (P1) dengan

kelompok perlakuan P9, P12, P15 (dosis genotropin tetap yaitu GH2 namun dengan dosis paparan UVB yang berbeda); kelompok kontrol (P1) dengan kelompok perlakuan P10, P13, P16 (dosis genotropin tetap, yaitu GH3 namun dengan dosis paparan UVB yang berbeda). Adapun pengertian P1, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16 adalah seperti yang sudah ada di Bab Metode Penelitian.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok perlakuan P1, P8, P11 dan P14 dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan genotropin GH1 pada paparan berbagai dosis UVB.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
UVB1	3	27,6300	2,4975	24,95	29,89
UVB2	3	25,9685	3,6314	22,24	29,50
UVB3	3	24,1863	3,0143	19,32	29,70
Total	12	27,9880	5,0510	19,32	37,23

p=0,048

Dari tabel 4 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,1672%). Pada kelompok paparan genotropin GH1 yang mendapat paparan UVB 10 mJ/cm² rerata persentase kontraksi kolagen turun menjadi 27,63%. Rerata kontraksi kolagen cenderung semakin menurun pada dosis paparan genotropin yang tetap (GH1) namun mendapat dosis paparan UVB ditambah, dapat di lihat pada gambar 5.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 4 tersebut menunjukkan perbedaan bermakna dengan p=0,048, dapat di lihat pada lampiran 5. Menunjukkan ada perbedaanan sintesis kolagen yang bermakna antara paparan

kombinasi genotropin dosis GH1 dan paparan UVB yang dosisnya meningkat dengan kelompok kontrol (tidak diberi paparan UVB maupun genotropin). Berhubung ada perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan genotropin dosis GH1 dan mendapat UVB 30 mJ/cm². Perbedaan rerata persentase kontraksi kolagen sebesar 9,981% menunjukkan perbedaan yang bermakna p=0,044. Dengan demikian sintesis kolagen kelompok kontrol, lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang sudah mendapat paparan genotropin GH1 namun masih mendapat paparan UVB dosis 30 mJ/cm². Kelompok yang mendapat paparan UVB dengan dosis 10 mJ/cm² dan dosis 20 mJ/cm² juga menampakkan sintesis kolagen yang kurang baik apabila dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini bisa dilihat dari semakin menurunnya rerata persentase kontraksi kalogen, apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun perbedaan rerata persentase kontraksi kolagennya tidak bermakna. Tidak ada perbedaan bermakna sintesis kolagen antara kelompok yang mendapat paparan UVB 10 mJ/cm², 20 mJ/cm² dan 30 mJ/cm² dengan kelompok yang mendapat paparan genotropin dosis GH1, hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 6.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P1, P9, P12 dan P15 dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok GH2 pada berbagai dosis paparan UVB.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
UVB1	3	31,5904	4,9225	28,32	37,25
UVB2	3	30,7432	5,6378	25,67	36,81
UVB3	3	30,0857	4,1570	25,70	38,40
Total	12	31,6466	4,8738	25,67	38,40

p=0,804

Dari tabel 5 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,16%). Pada kelompok paparan genotropin GH2 dan mendapat paparan UVB 10 mJ/cm² reratanya turun menjadi 31,59%. Pada paparan UVB 20 mJ/cm², rerata kontraksi kolagen menjadi lebih rendah, yaitu 30,74%. Rerata kontraksi kolagen cenderung semakin menurun pada paparan genotropin yang tetap (GH2) namun mendapat paparan UVB dosis ditambah, dapat di lihat pada gambar 5.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 5 tersebut tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 7. Nilai p=0,804 tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari kelompok paparan kombinasi genotropin dosis GH2 dan paparan UVB dosis meningkat dengan kelompok kontrol, sehingga tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

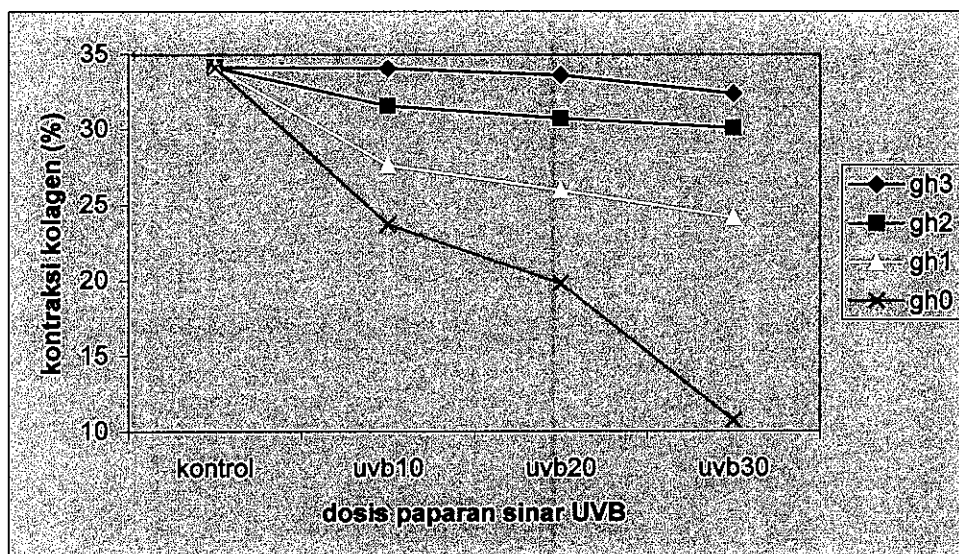
Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok perlakuan P1, P9, P12 dan P15 dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok GH3 pada berbagai dosis paparan UVB.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
UVB1	3	34,0909	6,2684	28,46	40,84
UVB2	3	33,6360	3,7431	30,87	37,90
UVB3	3	32,3932	2,0860	30,41	34,57
Total	12	33,5718	3,5434	28,46	40,84

p= 0,944

Dari tabel 6 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,16%). Pada kelompok paparan genotropin GH3 yang dipapari UVB 10 mJ/cm² reratanya turun menjadi 34,09%. Pada paparan UVB 20 mJ/cm², rerata kontraksi kolagen menjadi lebih rendah, yaitu 33,63%. Rerata kontraksi kolagen cenderung semakin menurun pada dosis paparan genotropin yang tetap GH3 namun dosis paparan UVB ditambah, dapat di lihat pada gambar 5.



Gambar 5. Penurunan kontraksi kolagen pada berbagai dosis paparan genotropin yang mendapat paparan UVB dengan dosis yang semakin tinggi.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 6 tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna, dapat di lihat pada lampiran 8. Nilai $p=0,944$ dari kelompok paparan kombinasi genotropin dosis GH3 dan mendapat paparan UVB dengan dosis yang meningkat, maka tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Uji ANOVA lainnya adalah persentase kontraksi kolagen antara kelompok kontrol (P1) dengan kelompok perlakuan P8, P9, P10 (dosis paparan UVB tetap, yaitu 10 mJ/cm^2 namun dengan dosis paparan genotropin yang berbeda); kelompok kontrol (P1) dengan kelompok perlakuan P11, P12, P13 (dosis paparan UVB tetap, yaitu 20 mJ/cm^2 namun mendapat dosis paparan genotropin yang berbeda); kelompok kontrol (P1) dengan kelompok perlakuan P14, P15, P16 (dosis paparan UVB tetap, yaitu 30 mJ/cm^2 namun mendapat dosis paparan genotropin yang berbeda).

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P1, P8, P9 dan P10 dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok UVB 10 mJ/cm^2 pada berbagai dosis paparan GH.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
GH1	3	27,6308	2,4970	24,95	29,89
GH2	3	31,5907	4,9221	28,32	37,25
GH3	3	34,0902	6,2680	28,46	40,84
Total	12	31,8681	4,6814	24,95	40,84

$p= 0,300$

Dari tabel 7 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,16%). Pada kelompok paparan UVB 10 mJ/cm^2 yang mendapat

paparan genotropin GH1 reratanya turun menjadi 27,63%. Rerata kontraksi kolagen cenderung semakin meningkat pada dosis paparan UVB yang tetap (10 mJ/cm^2) namun mendapat paparan genotropin dengan dosis ditambah, dapat di lihat pada gambar 6.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 7 tersebut tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 9. Nilai $p=0,300$ tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari kombinasi paparan UVB 10 mJ/cm^2 dan mendapat paparan genotropin dengan dosis yang meningkat, maka tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P1, P11, P12 dan P13 dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan UVB dosis 20 mJ/cm^2 dan mendapat paparan genotropin dosis meningkat.

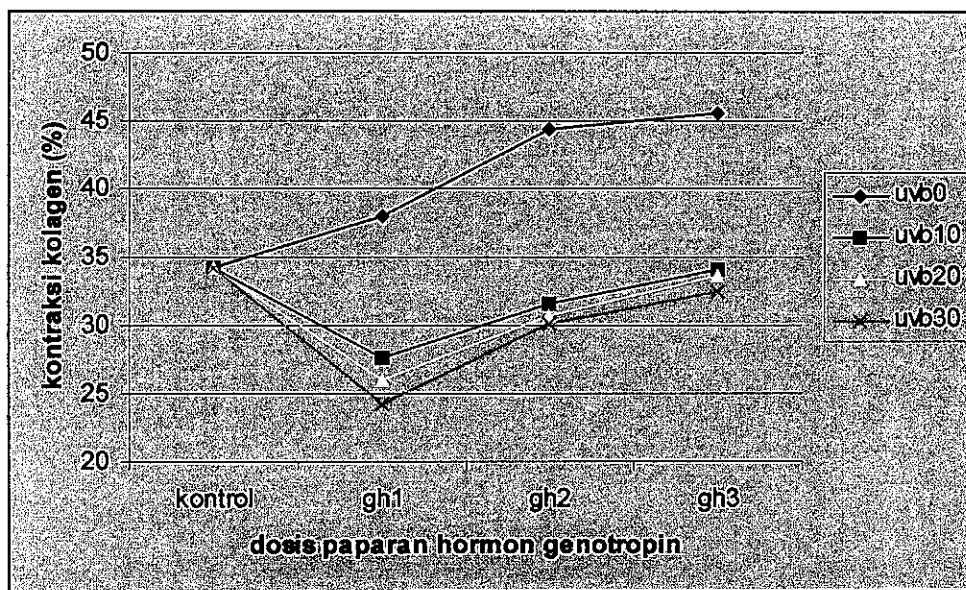
	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
GH1	3	25,9685	3,6314	22,24	29,50
GH2	3	30,7432	5,6378	25,67	36,81
GH3	3	33,6360	3,7431	30,87	37,90
Total	12	31,1287	4,8767	22,24	37,90

$p= 0,132$

Dari tabel 8 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,16%). Pada kelompok paparan genotropin GH1 ($30 \mu\text{IU/ml}$) yang mendapat paparan UVB 20 mJ/cm^2 reratanya turun menjadi 25,96%. Pada paparan UVB 20 mJ/cm^2 dan mendapat paparan genotropin dengan dosis yang meningkat pada GH2, rerata kontraksi kolagen menjadi lebih tinggi, yaitu 30,74%. Rerata kontraksi kolagen

cenderung semakin meningkat pada dosis paparan UVB yang tetap (20 mJ/cm^2) namun mendapat dosis paparan genotropin ditambah, dapat di lihat pada gambar 6.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 8 tersebut tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 10. Nilai $p=0,132$ tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi paparan UVB 20 mJ/cm^2 dan paparan genotropin yang dosisnya meningkat. Berhubung tidak ada perbedaan yang bermakna, maka tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.



Gambar 6. Kontraksi kolagen pada berbagai dosis paparan UVB yang mendapat paparan genotropin dengan dosis yang meningkat.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P1, P14, P15 dan P16 dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok paparan UVB dosis 30 mJ/cm² dan mendapat paparan genotropin meningkat.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
GH1	3	25,9685	3,6314	22,24	29,50
GH2	3	30,7432	5,6378	25,67	36,81
GH3	3	33,6360	3,7431	30,87	37,90
Total	12	31,1287	4,8767	22,24	37,90

p= 0,136

Dari tabel 9 terlihat bahwa rerata kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok kontrol (34,16%). Pada kelompok paparan UVB 30 mJ/cm² yang mendapat paparan genotropin dosis GH1 reratanya turun menjadi 24,18%. Pada kelompok paparan UVB 30 mJ/cm² dan mendapat paparan genotropin dosis GH2, rerata kontraksi kolagen menjadi lebih tinggi, yaitu 30,08%. Rerata kontraksi kolagen cenderung semakin meninggi pada dosis paparan UVB yang tetap (30 mJ/cm²) namun mendapat paparan genotropin ditambah, dapat di lihat pada gambar 7.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 9 tersebut tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 11. Nilai p = 0,136 tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari kombinasi paparan UVB 30 mJ/cm² dan mendapat paparan genotropin dengan dosis yang meningkat. Berhubung tidak ada perbedaan yang bermakna, maka tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Berbeda dengan tujuan khusus ke tiga, yang membedakan sintesis kolagen pada biakan fibroblas jaringan kulit normal manusia antara yang mendapat paparan kombinasi genotropin dan paparan UVB dengan biakan fibroblas yang tidak mendapat paparan UVB maupun genotropin (P1 atau kontrol), maka pada tujuan khusus ke empat ini adalah membandingkan dengan biakan yang mendapat paparan sinar UVB saja atau genotropin saja dengan kelompok paparan kombinasi antara GH dan UVB.

Untuk yang diberi paparan UVB saja, maka terdapat tiga uji ANOVA lagi. Ketiga uji ANOVA tersebut yaitu P5, P8, P9, P10 (untuk paparan UVB 10 mJ/cm²) ; P6, P11, P12, P13 (untuk paparan UVB 20 mJ/cm²) dan P7, P14, P 15, P16 (untuk paparan UVB 30 mJ/cm²).

Sedangkan yang mendapat paparan genotropin saja, juga terdapat tiga uji ANOVA lagi. Masing-masing adalah P2, P8, P11, P14 (untuk paparan genotropin dosis GH1); P3, P9, P12, P15 (untuk paparan genotropin dosis GH2); dan P4, P10, P13, P16 (untuk paparan genotropin dosis GH3).

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P5, P8, P9 dan P10 dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok paparan UVB 10 mJ/cm² dan mendapat paparan GH dosis meningkat.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
GH0	3	34,1672	2,8941	31,48	37,23
GH1	3	27,6300	2,4975	24,95	29,89
GH2	3	31,5904	2,8420	28,32	37,25
GH3	3	34,0909	6,2684	28,46	40,84
Total	12	29,1107	6,2491	16,79	40,84

p= 0,136

Dari tabel 10 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen terendah ada pada kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 10 mJ/cm² tanpa mendapat paparan genotropin (23,13%). Pada kelompok paparan dosis UVB 10 mJ/cm² yang mendapat paparan genotropin dosis GH1 reratanya naik menjadi 27,63%. Masih pada dosis paparan UVB yang sama 10 mJ/cm² namun mendapat dosis genotropin yang meningkat pada GH2, rerata kontraksi kolagen menjadi lebih tinggi, yaitu (31,59%). Rerata kontraksi kolagen pada dosis paparan UVB ini mencapai nilai tertinggi ketika dipapari genotropin dosis GH3 (34,09%). Kontraksi kolagen cenderung semakin meningkat pada paparan UVB yang tetap 10 mJ/cm² namun dosis paparan hormon genotropin ditambah, dapat di lihat pada gambar 7.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 21 tersebut tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 12. Nilai p= 0,136 tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi UVB 10 mJ/cm² dan paparan genotropin yang dosisnya meningkat. Berhubung tidak ada perbedaan yang bermakna, maka tidak dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Rerata persentase kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P6, P11, P12 dan P13 dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Rerata kontraksi kolagen pada kelompok paparan UVB 20 mJ/cm² dengan mendapat paparan GH yang meningkat.

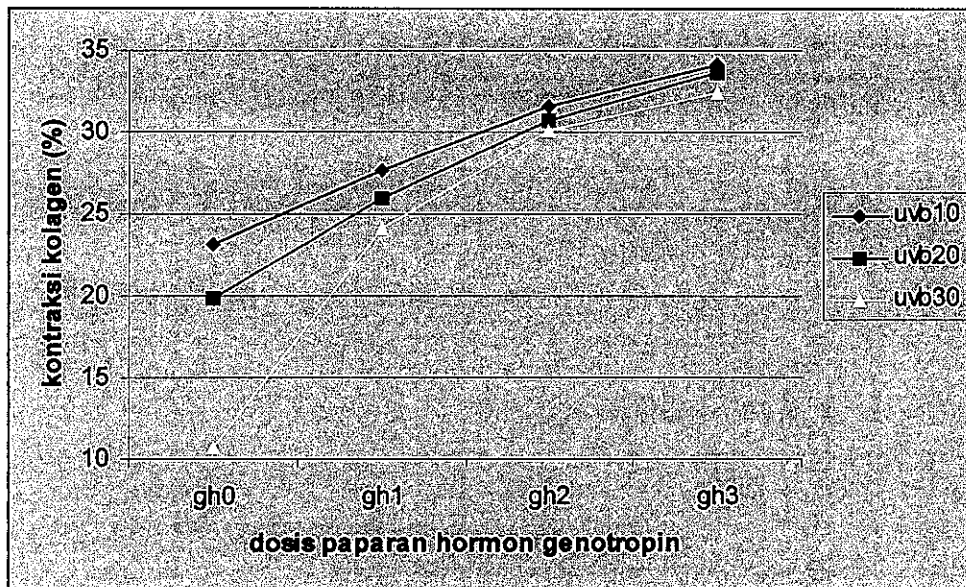
	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
GH0	3	19,8225	2,2105	17,65	22,07
GH1	3	25,9685	3,6314	22,24	29,50
GH2	3	30,7432	5,6378	25,67	36,81
GH3	3	33,6360	3,7431	30,87	37,90
Total	12	27,5426	6,4392	17,65	37,90

F=6,855, p= 0,013

Dari tabel 11 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen terendah ada pada kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 20 mJ/cm² tanpa paparan genotropin (19,82%). Pada kelompok paparan UVB 20 mJ/cm² yang mendapat paparan genotropin dosis GH1 reratanya naik menjadi 25,97%. Masih pada kelompok paparan UVB 20 mJ/cm² namun paparan genotropin yang meningkat pada GH2, rerata kontraksi kolagen menjadi lebih tinggi, yaitu 30,74%. Rerata kontraksi kolagen pada paparan UVB ini mencapai nilai tertinggi ketika mendapat paparan genotropin GH3 (33,63%). Sintesis kolagen cenderung semakin meningkat pada dosis paparan UVB yang tetap 20 mJ/cm² namun dosis paparan genotropin ditambah, dapat di lihat pada gambar 7.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 11 tersebut menunjukkan adanya kontraksi kolagen yang berbeda bermakna, lampiran 13. Nilai F = 6,855 dan p=0,013 tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi dosis UVB 20 mJ/cm² dan paparan genotropin dengan dosis meningkat.

Hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 14, menunjukkan bahwa perbedaan kontraksi kolagen yang bermakna terjadi antara kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 20 mJ/cm² tanpa mendapat paparan genotropin dengan kelompok yang mendapat paparan UVB dalam dosis yang sama namun mendapat genotropin dosis GH2 dan dosis GH3.



Gambar 7. Peningkatan kontraksi kolagen pada paparan UVB dosis 10, 20 dan 30 mJ/cm^2 setelah dipapari genotropin dengan dosis yang semakin meningkat.

Rerata persentase kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P7, P14, P15 dan P16 dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Rerata kontraksi kolagen pada kelompok paparan UVB 30 mJ/cm^2 dan mendapat paparan dosis GH yang meningkat.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
GH0	3	10,7542	3,9844	7,20	15,06
GH1	3	24,1863	5,2208	19,32	29,70
GH2	3	30,0857	7,2201	25,70	38,40
GH3	3	32,3932	2,0860	30,41	34,57
Total	12	24,3549	9,7517	7,20	38,40

F=11,37, p= 0,003

Pada tabel 12 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen terendah ada pada kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 30 mJ/cm^2 tanpa paparan genotropin

(10,75%). Rerata kontraksi kolagen tersebut semakin meningkat seiring dengan penambahan dosis genotropin. Pada kelompok paparan dosis UVB 30 mJ/cm² yang mendapat paparan genotropin dosis GH1 reratanya naik menjadi 24,19%. Masih pada paparan dosis UVB yang sama 30 mJ/cm² namun dosis paparan genotropin yang meningkat, rerata kontraksi kolagen menjadi lebih tinggi, yaitu 30,09%. Rerata kontraksi kolagen pada paparan UVB ini mencapai nilai tertinggi ketika dipapari genotropin GH3 (32,39%). Sintesis kolagen cenderung semakin meningkat pada dosis paparan UVB yang tetap (30 mJ/cm²) namun dosis paparan genotropinnya ditambah, dapat di lihat pada gambar 7.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 12 tersebut menunjukkan adanya kontraksi kolagen yang berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 15. Nilai $F=11,375$ dan $p=0,003$ tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi UVB 30 mJ/cm² dan paparan genotropin dengan dosis meningkat.

Hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 16, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kontraksi kolagen yang bermakna antara kelompok yang mendapat paparan UVB dosis 20 mJ/cm² tanpa mendapat paparan genotropin dengan kelompok yang mendapat paparan UVB dalam dosis yang sama namun dipapar genotropin dosis GH1, GH2 dan dosis GH3.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P2, P8, P11 dan P14 dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok paparan GH1 dengan mendapat paparan dosis UVB yang meningkat.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
UVB0	3	38,0443	3,3303	35,05	41,63
UVB1	3	27,6300	2,4975	24,95	29,89
UVB2	3	25,9685	3,6314	22,24	29,50
UVB3	3	24,1863	5,2208	19,32	29,70
Total	12	28,9573	6,4922	19,32	41,63

F=8,034, P= 0,008

Dari tabel 13 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok yang dipapari genotropin dosis GH1 tanpa paparan UVB (38,04%). Pada kelompok dosis genotropin yang sama, namun dosis paparan UVB 10 mJ/cm² rerata persentase kontraksi kolagen turun menjadi 27,63%. Masih pada dosis genotropin yang sama (GH1) namun dosis paparan UVB ditingkatkan dua kali menjadi 20 mJ/cm², rerata kontraksi kolagen menjadi lebih rendah, yaitu 25,97%. Rerata kontraksi kolagen paparan dosis genotropin ini mencapai nilai terendah ketika dipapari UVB dosis 30 mJ/cm² (24,19%). Sintesis kolagen semakin menurun pada paparan dosis genotropin yang tetap (GH1) namun dosis paparan UVB ditambah, dapat di lihat pada gambar 8.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 13 tersebut menunjukkan adanya kontraksi kolagen yang berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 16. Nilai F=8,034, p=0,008 tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi genotropin GH1 dan paparan UVB dengan dosis meningkat.

Hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 17, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase kontraksi kolagen bermakna antara kelompok yang dipapari genotropin dosis GH1 tanpa mendapat paparan UVB dengan kelompok yang dipapari genotropin dalam dosis yang sama (GH1) namun mendapat paparan UVB dosis 10 mJ/cm², 20 mJ/cm² dan dosis 30 mJ/cm².

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P3, P9, P12 dan P15 dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Rerata kontraksi kolagen antara kelompok paparan GH2 dan mendapat paparan UVB dosis meningkat.

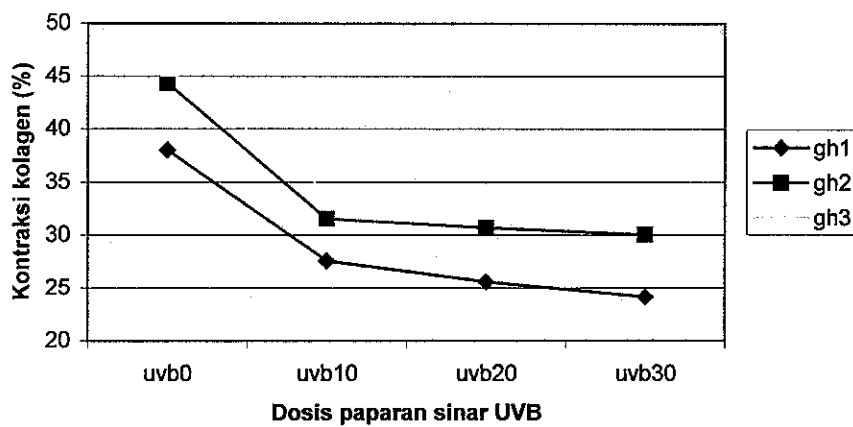
	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
UVB0	3	44,3694	6,4275	38,12	50,96
UVB1	3	31,5904	4,9225	28,32	37,25
UVB2	3	30,7432	5,6378	25,67	36,81
UVB3	3	30,0857	7,2001	25,70	38,40
Total	12	34,1972	8,0659	25,67	50,96

F= 3,730, p= 0,061

Dari tabel 14 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok yang dipapari genotropin dosis GH2 tanpa paparan UVB (44,37%). Pada kelompok dosis genotropin yang sama, namun mendapat paparan UVB 10 mJ/cm² rerata persentase kontraksi kolagen turun menjadi 31,59%. Masih pada dosis genotropin yang sama (GH2) namun mendapat paparan UVB ditingkatkan dua kali menjadi 20 mJ/cm², rerata kontraksi kolagen menjadi lebih rendah, yaitu 30,74%. Rerata kontraksi kolagen pada paparan genotropin ini mencapai nilai terendah ketika dipapari UVB dosis 30

mJ/cm² (30,09%). Sintesis kolagen semakin menurun pada dosis genotropin yang tetap (GH2) namun mendapat paparan UVB ditambah, dapat di lihat pada gambar 8.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 14 tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 18. Nilai F= 3,730, p=0,061 tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi genotropin GH2 dan paparan UVB dengan dosis



Gambar 8. Penurunan kontraksi kolagen pada paparan genotropin dosis GH1, GH2 dan GH3 setelah mendapat paparan UVB dengan dosis meningkat.

Rerata kontraksi kolagen dalam FPCL pada kelompok P4, P10, P13 dan P16 dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Rerata persentase kontraksi kolagen kelompok hormon genotropin GH3 (100 µIU/ml) pada berbagai paparan UVB.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
UVB0	3	45,6868	2,2678	44,13	48,29
UVB1	3	34,0909	6,2684	28,46	40,84
UVB2	3	33,6360	3,7431	30,87	37,90
UVB3	3	32,3932	2,0860	30,41	34,57
Total	12	36,4517	6,5462	28,46	48,29

F=7,342, p=0,011

Dari tabel 15 terlihat bahwa rerata persentase kontraksi kolagen tertinggi ada pada kelompok yang dipapari genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB (45,69%). Pada kelompok dosis genotropin yang sama, namun dosis paparan UVB 10 mJ/cm² rerata persentase kontraksi kolagennya turun menjadi 34,09%. Masih pada dosis genotropin yang sama (GH3) namun dosis paparan UVB ditingkatkan dua kali menjadi 20 mJ/cm², rerata kontraksi kolagen menjadi lebih rendah, yaitu 33,64%. Rerata kontraksi kolagen pada dosis genotropin ini mencapai nilai terendah ketika dipapari UVB dosis 30 mJ/cm² (32,39%). Sintesis kolagen semakin menurun pada dosis genotropin yang tetap (GH3) namun dosis paparan UVB ditambah, dapat di lihat pada gambar 8.

Hasil uji ANOVA perbedaan rerata kontraksi kolagen dari tabel 15 tersebut menunjukkan kontraksi kolagen yang berbeda bermakna, dapat di lihat pada lampiran 19. Nilai $F=7,342$, $p=0,011$ tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan sintesis kolagen yang bermakna dari paparan kombinasi genotropin GH3 dan paparan UVB yang dosisnya meningkat. Karena ada perbedaan bermakna, maka dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 20, menunjukkan bahwa perbedaan kontraksi kolagen yang bermakna $p=0,029$ terjadi antara kelompok genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB dengan genotropin dosis sama namun dipapari sinar UVB dosis 10 mJ/cm². Perbedaan rerata kontraksi kolagen yang bermakna $p = 0,024$, juga terjadi pada kelompok paparan genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB dengan kelompok paparan genotropin dosis sama tetapi dipapari UVB dosis 20 mJ/cm². Perbedaan rerata kontraksi kolagen paling besar (13,29%), terjadi antara kelompok

paparan genotropin GH3 tanpa paparan UVB dengan kelompok paparan genotropin dosis sama namun dipapari UVB 30 mJ/cm² p = 0,014.

B. Proliferasi fibroblas

Rerata indeks proliferasi fibroblas kelompok kontrol (tanpa paparan UVB maupun paparan genotropin) dan kelompok tanpa paparan UVB namun ditambah paparan genotropin yang semakin meningkat dari dosis GH1, GH2 dan GH3, dapat dilihat pada tabel 16.

Tabel 16. Rerata indeks proliferasi fibroblas kelompok kontrol dan kelompok tanpa paparan UVB namun diberi dosis genotropin semakin meningkat.

	N	Rerata	Simpang Baku	Minimum	Maximum
Kontrol	3	2,1467	3,2189	2,11	2,17
GH1	3	2,3500	3,0004	2,32	2,38
GH2	3	2,4200	2,0006	2,40	2,44
GH3	3	2,8033	0,3308	2,56	3,18
Total	12	2,4300	0,2864	2,11	3,18

F=8,094, P= 0,008

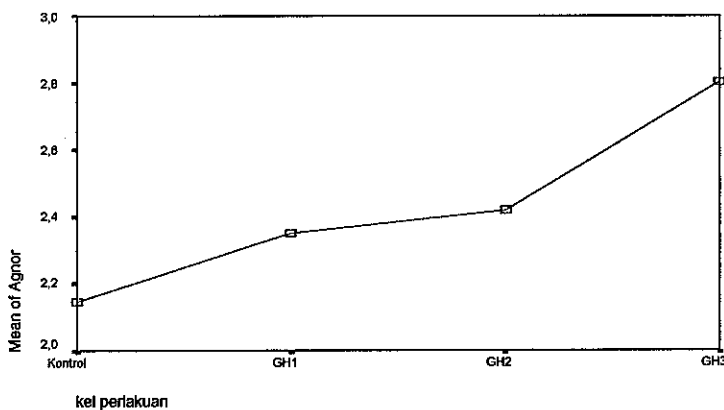
Tabel 16 menggambarkan bahwa indeks proliferasi fibroblas mengalami kenaikan, seiring dengan penambahan dosis genotropin tanpa paparan UVB, dapat di lihat pada gambar 9. Pada kelompok kontrol (GH0), rerata indeks proliferasi fibroblas sebesar 2,15 dan terus meningkat hingga akhirnya mencapai 2,80 pada dosis genotropin GH3 tanpa paparan UVB (kelompok GH3)

Hasil uji ANOVA dari tabel 16 tersebut menunjukkan adanya perbedaan rerata indeks proliferasi fibroblas yang bermakna, dapat di lihat pada lampiran 21. Nilai F= 8,094, p=0,008 tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan indeks proliferasi yang bermakna dari kelompok kontrol dengan kelompok tanpa paparan UVB namun mendapat

paparan genotropin yang semakin besar dosisnya. Karena ada perbedaan bermakna, maka dilanjutkan dengan *post hoc test Tukey*.

Hasil *post hoc test Tukey* dapat di lihat pada lampiran 22, menunjukkan ada perbedaan indeks proliferasi fibroblas yang bermakna $p=0,006$ antara kelompok kontrol (tanpa paparan UVB dan tanpa paparan genotropin) dengan kelompok paparan genotropin dosis GH3 ($100\mu\text{IU/ml}$) tanpa paparan UVB. Sementara itu juga terdapat perbedaan indeks proliferasi fibroblas antara kelompok GH1 (genotropin dosis GH1 tanpa paparan UVB) dengan kelompok GH3 (genotropin dosis GH3 tanpa paparan UVB) sebesar 0,4533. Perbedaan rerata indeks proliferasi fibroblas sebesar itu juga sudah menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p=0,042$. Perbedaan indeks proliferasi fibroblas di antara kelompok lainnya, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Paparan genotropin dengan dosis semakin meningkat berpengaruh bermakna terhadap meningkatnya indeks proliferasi sel fibroblas. Genotropin terbukti mempunyai efek stimulasi terhadap pertumbuhan sel fibroblas.



Gambar 9. Kenaikan indeks proliferasi fibroblas pada kelompok perlakuan tanpa paparan sinar UVB namun diberi genotropin dengan dosis yang semakin besar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gilchrest B.A., Yaar M. Aging of skin. In: Freedberg I.M., Eizen A.Z., Wolff K. Fitzpatrick TB., Austen KF., Goldsmiyah LK., Katz SI. *Dermatology in general medicine*, 6th. New York:Mc Graw Hill,2003 ;1698-1706.
2. Fisher, G. J., Wang, Z., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med*, 1997: 337; 1419-1429.
3. Uitto, J. (1997). Understanding premature skin aging. *N Engl J Med*, 1997: 337; 1463-1465.
4. Gilchrest B.A. A Review of skin aging and its medical therapy. *British Journal of Dermatology*, 1996: 135; 867-875.
5. Van der Werff ten Bosch JJ, Bot A. Effects of human pituitary growth hormone on body composition. *Neth J Med*, 1987: 30; 220-227.
6. Rudman D, Feler AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Golberg Af. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med*,1990: 323;1-6.
7. Mary Lee Vance, M.D. Can growth hormone prevent aging?. *N Engl J Med*, 2003: 348; 779-780.
8. Jin Ho Chung MD. PhD, Valerie N, Hanft MD, Sewon K. MD. Aging and photoaging. *J Am Acad Dermatol*, 2003: 496; 90-7.
9. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*, Blackwell Munksgaard, 2002: 11; 398-405
10. Warren R, Gartstein V, Kligman AM, Montagna W, Allendorf RA, Ridder GM. Age, sunlight, and facial skin: a histologic and quantitative study. *J Am Acad Dermatol* 1991: 25; 751-760. [Erratum, *J Am Acad Dermatol* 1992; 26:558.]
11. Gilchrest BA, Yaar M. Aging and photoaging of the skin: observations at the cellular and molecular level. *British Journal Dermatol* 1992;127:Suppl 41:25-30.
12. Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Science*, 2000: 23; S22-S26.
13. Ayako H, Yasuhiro K, Ken I, Yasuhiro N, Xuenzhu, Tomohiro B, Takenori T, Masayuki Y. Ultraviolet a irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: Protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*, 2005: 124; 825-832.
14. Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S. E. G., Datta, S. C., Wang, Z. Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G. J., Voorhees, J. J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol*, 2001: 158; 931-942.
15. Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:285.

16. Shinya Toyokuni. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *J Pathol Int*, 1999; 49; 91-102.
17. Yohiro Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J Dermatol Science*, 2001; 27; S1-S4.
18. Biesalski H.K., Bemeburg M, Grune T, Kerscher M, Krutmann J, Raab W, Reimann J, Reuther T. Hohenheimer consensus talk oxidative and premature skin aging. *Exp Dermatol*, 2003; 12; 3-15.
19. Michael Lam MPH., Sulindro M. MD. Aging skin. Anti-aging research brief. Academy of anti-aging research 1th. Fair Oaks, Pasadena CA, USA, 2001; 1-6.
20. Robert S, Stern MD. Treatment of photoaging. *N Engl J Med*, 2004;350; 1526-34.
21. Fisher, G. J., Datta, S., Wang, Z., Li, X-Y, Quan, T., Chung, J. H., Kang, S., Voorhees, J. J. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J. Clin. Invest*, 2000;106; 663-670.
22. John E, Morley. Hormon aging and endocrine disorder in elderly. Philip Felig, John D, Baxter, Lawrence A. In. *Endocrinology and metabolism*. 3th, McGraw-Hill, New York 1995; 1813-1831.
23. Daniel Rudmann, MD. Growth hormone, body composition, and aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 1985; 33 (11); 800-07.
24. Maxine A, Papadakis MD, Deborah G, Dennis B, Mary T. Growth hormone replacement in healthy older men improve body composition but not functional ability. *Annal of Internal Medicine*, 1996; 124; 708-716.
25. Hossein Gharib, MD. Americans association of clinical endocrinologists medical guideline for clinical practice for growth hormone use in adult and children-2003 update. *Endocrine practice*, 2003; 9 (1); 65-76.
26. Mari-Anne H, Jaan P, Timò O. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: Identification of betacellulin as a novel β -cell mitogen. *Endocrinology*, 1999; 139 (4); 1494-9.
27. Grace Wong. The fountain of youth. *Anti aging group human growth hormone*, 2005; 3-5.
28. Klatz Ronald, Kahn C. A shot at youth, Klatz Ronald. *Grow young with HGH*. New York: Happer Perennial, 1997; 277-85.
29. Uitto J. Collagen. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. Vol. 1. New York: McGraw-Hill, 2003; 165-78.
30. Fresney RI. Primary culture. In. *Culture of animal cells, A manual of basic technique*, 4th United States: Wiley-Liss Inc, 2000; 149-75.
31. Gilcrest BA. Relationship between actinic damage and chronological aging in keratinocyte cultures of human skin. *J Invest Dermatol* 1979; 72 (5); 219-23.
32. Assessment of collagen lattice by B-scan echography. *Skin research and technology*, 2002; 8; 173-7.
33. George D, Pins, Maura E, Collin-pavao, Livingston, martin L. Plasmin trigger rapid contraction and degradation of fibroblast-populated collagen lattice. *J Invest Dermatol*, 2000; 114; 647-670.

34. Shigenori N, Pamela P, Frederick G. Long-term culture of fibroblast in contracted collagen gel; effects on cell growth and biosynthetic activity. *J of Investigative Dermatology*, 1989; 93; 792-8.
35. Crocher J, Boldy D, Egan M, How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158; 135-88.
36. Barzail AA, Golberg I, Yulash M, et al. Silver stained nucleolar organizer regions (AgNOR) as a prognostic value in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*, 1998; 20(5); 473-7.
37. MacKie RM, White SI, Seyweight MM dkk. An assessment of the value of AgNOR staining in the identification of dysplastic and other borderline melanocytic naevi. *Br J Dermatol*, 1989, 120; 511-6.
38. Susilowati. Pengaruh kombinasi triamsinolon asetonid dan 5-fluorourasil pada biakan fibroblast jaringan keloid kajian dengan fibroblast populated collagen lattice dan argyrophilic nucleolar organizer region. Laporan karya akhir bagian Kesehatan Kulit dan Kelamin, FK UNDIP, 2004; 1-36.
39. Monograph. Genotropin. Pharmacia dan Upjohn, 1998; 1-37.
40. John P, Monson. Long-term experience with GH replacement therapy: efficacy and safety. *European Journal of Endocrinology*, 2003; 148; S9-S14.
41. Connie P, Emely C, Jillian E, Lowe, Leena K, Reijo J. Ultraviolet-B-induced apoptosis and cytokine release in xeroderma pigmentosum keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2000; 115; 687-602.
42. Brenneisen P, Wlaschek M. Activation of protein kinase CK2 is an early step in the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) and stromelysin-1 (MMP3) protein levels in human dermal fibroblast. *Biochemical Journal*, 2002; 365; 31-40.