

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK
KACANG KEDELAI (*Glycine max (L.) Merr*)
TERHADAP KONSENTRASI PDGF DAN
DENSITAS KOLAGEN
(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit BALB/c
Yang Dipapar Sinar UVB)**

**Tesis
Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Bayu Murdalin
MBK2220010310**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2024**

TESIS
PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK
KACANG KEDELAI (*Glycine max (L.) Merr*)
TERHADAP KONSENTRASI PDGF DAN
DENSITAS KOLAGEN
(Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit BALB/c
Yang Dipapar Sinar UVB)

Disusun oleh:


Bayu Murdalim


MBK2220010310

Yang dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 26 Agustus 2024 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima


Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050


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

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


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

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



KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena telah memberikan Rahmat kesehatan dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal tesis yang berjudul” PENGARUH PEMBERIAN KRIM EKSTRAK KACANG KEDELAI (*Glycine max (L.) Merr*) TERHADAP KONSENTRASI PDGF DAN DENSITAS KOLAGEN (Studi Eksperimental *in vivo* Pada Mencit BALB/c Yang Dipapar Sinar UVB)” tepat pada waktunya.

Proposal tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu tugas akhir di Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh dosen yang telah membantu dan mendukung serta memotivasi penulis dalam penyelesaian penulisan proposal tesis.

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan selaku pembimbing I yang memberi bimbingan masukan selama penyusunan proposal tesis ini.

4. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B selaku pembimbing II yang telah memberikan masukan serta arahan dan semangat dalam penyusunan proposal tesis ini.
5. Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M. Kes selaku penguji I yang telah meluangkan banyak waktu, memberikan semangat serta masukan selama penyusunan proposal tesis ini.
6. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku penguji II yang juga telah meluangkan banyak waktu, memberikan semangat serta masukan selama penyusunan proposal tesis ini.
7. Dr. dr. Hadi Sarosa, M. Kes selaku penguji III yang telah memberikan masukan serta arahan dan semangat untuk perbaikan proposal tesis ini.
8. Civitas Akademika Prodi Magister Biomedik yang telah memberikan semangat, dan membantu segala hal terkait dalam penyelesaian proposal tesis ini.
9. Kedua Orang Tua, Suami dan Anak-anak tercinta yang telah memberikan doa, semangat, dukungan sehingga proposal tesis ini dapat disidangkan.

Akhir kata penulis menyampaikan semoga karya sederhana ini dapat bermanfaat untuk semuanya, khususnya bagi perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran.

Semarang, Juni 2024

Hormat saya,



Bayu Murdalini

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR ISTILAH	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Originalitas Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
1.5.1 Manfaat teoritis	5
1.5.2 Manfaat praktis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Sinar Ultraviolet (UV)	7
2.2 Kulit	9

2.2.1 Epidermis	10
2.2.2 Dermis.....	11
2.2.3 Subkutis	12
2.3 <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (PDGF).....	12
2.3.1 Pengertian	12
2.4 Peran PDGF Dalam Sintesis Kolagen	14
2.2.4 Fisiologi kulit.....	17
2.5 Kolagen	18
2.5.1 Definisi Kolagen.....	18
2.5.2 Sintesis Kolagen	20
2.5.3 Mekanisme Kerusakan Kolagen	22
2.6 Kacang Kedelai	24
2.6.1 Taksonomi dan Morfologi.....	24
2.6.2 Kandungan Kacang Kedelai	27
2.7 Efek Ekstrak Kacang Kedelai Pada Penuaan Kulit	31
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	33
3.1 Kerangka Teori	33
3.2 Kerangka Konsep	36
3.3 Hipotesis	36
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	37
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	38
4.2.1 Populasi Penelitian.....	38
4.2.2 Sampel Penelitian	38
4.3 Besar Sampel.....	39

4.4 Variabel dan Definisi Operasional.....	40
4.4.1 Variabel Penelitian	40
4.4.2 Definisi Operasional	40
4.5 Waktu dan Tempat Penelitian	41
4.6 Alat dan Bahan	41
4.6.1 Alat.....	41
4.6.2 Bahan	42
4.7 Cara Penelitian	42
4.7.1 Perolehan Ethical Clearance	42
4.7.2 Cara Pembuatan Ekstrak Kacang Kedelai	42
4.7.3 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Kacang Kedelai.....	42
4.7.4 Penetapan Dosis	43
4.7.5 Penyinaran UVB dan Perlakuan pada Subjek Penelitian.....	44
4.7.6 Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen	44
4.7.7 Pengambilan Sampel Jaringan	45
4.7.8 Pembuatan Blok Parafin	45
4.7.9 Prosedur Pengamatan Kepadatan Kolagen.....	46
4.7.10 Pengukuran kadar PDGF Menggunakan Metode ELISA.....	47
4.8 Analisa Data.....	48
4.9 Alur Penelitian	50
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	51
5.1 Hasil Penelitian.....	51
5.1.1. Validasi Mencit Model Kerusakan Kulit akibat Paparan UVB	51
5.1.2 Kadar PDGF	52
5.1.3 Densitas Kolagen	54

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian.....	57
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	60
6.1 Kesimpulan.....	60
6.2 Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	68



DAFTAR ISTILAH

ADP	: <i>Adenosin difosfat</i>
AMP	: <i>Antimicrobial peptida</i>
COX	: <i>Dyclooxygenase</i>
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAG	: <i>Diacylglycerol</i>
ECM	: <i>Matriks ekstraseluler</i>
MAPK	: <i>Mitogen activation protein kinase</i>
MMPS	: <i>Matriks metalloproteinases</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PI3K	: <i>Fosfolipase 3'-kinase</i>
ROS	: <i>Reaktif oksigen spesies</i>
STAT	: <i>Signal transduser and activator of transcription</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	: <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>

DAFTAR GAMBAR

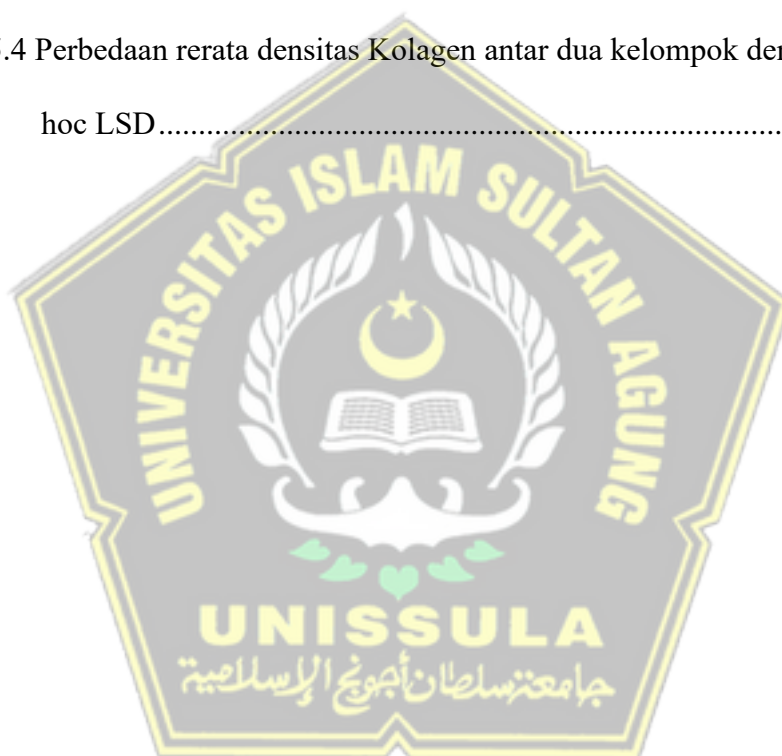
Gambar 2.1 Perubahan Struktur Kulit Akibat Radiasi UV	8
Gambar 2.2 Anatomi Kulit Manusia.	10
Gambar 2.3 TGF- β meregulasi sintesis kolagen dan matrix ekstraseluler.....	15
Gambar 2.4 Pengaruh Radiasi UV pada Sintesis Kolagen	16
Gambar 2.5 Kolagen pada kulit seiring pertambahan usia.	19
Gambar 2.6 Sintesis kolagen.....	20
Gambar 2.7 Struktur molekul kolagen. Pro-kolagen terdiri dari 2 rantai α 1 dan 1 rantai α 2 yang bergabung menjadi triple helix. Domain pro-peptida pada terminal karboxil dan terminal amino terpisah menghasilkan pembentukan kolagen matur.	22
Gambar 2.8 Tanaman Kacang Kedelai.....	25
Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori	35
Gambar 3.2 Skema Kerangka Konsep	36
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian.....	50
Gambar 5.1 Secara makroskopis terlihat tidak terdapat kerutan pada mencit yang tidak terpapar UVB (A) dibandingkan dengan yang terpapar UVB (B). Densitas elastin yang terlihat sebagai warna merah (panah hitam) lebih tinggi pada kelompok tanpa paparan UVB (C), dibanding dengan kelompok dengan paparan UVB (D).....	51
Gambar 5.2 Grafik rerata kadar PDGF pasca pemberian krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) pada mencit yang terpapar UVB	54

Gambar 5.3 Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner
dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan densitas Kolagen
yang signifikan..... 56



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	4
Tabel 5.1 Data Hasil Analisis Kadar PDGF	53
Tabel 5.2 Perbedaan rerata kadar PDGF antar dua kelompok dengan Uji Post hoc Tamhane.....	53
Tabel 5.3 Data Hasil Analisis Densitas Kolagen.....	55
Tabel 5.4 Perbedaan rerata densitas Kolagen antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD.....	56



ABSTRAK

Latar Belakang: penuaan dini diakibatkan aktivitas berlebihan dibawah sinar matahari, menyebabkan stres oksidatif serta reaksi inflamasi, termasuk penuaan dini, mengubah struktur kulit, antara lain pemendekan dan penebalan serat kolagen, kerusakan serat elastis, dan perubahan proporsi jenis kolagen pada dermis. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian krim ekstrak kacang kedelai (*Glycine max (L.) Merr*) terhadap konsentrasi PDGF dan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB.

Metode: Penelitian eksperimen *Post Test Only Control Group Design* menggunakan 30 mencit BALB/c dengan 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus sehat (K1), kelompok Negatif (K2) tanpa paparan UVB, Kelompok positif (K3) dipapar UVB dan diolesi krim vitamin E, Kelompok perlakuan dosis krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) 10% (K4) dan dosis KEKD 20% (K5). Analisa data menggunakan uji statistik *One way anova*.

Hasil: terdapat perbedaan yang signifikan rerata kadar PDGF kelompok (K1) $149,5 \pm 7,1$ ng/mL, (K2) $40,4 \pm 4,4$ ng/mL, (K3) $88,6 \pm 41,7$ ng/mL, (K4) $323,2 \pm 86,1$ ng/mL, dan (K5) $330,2 \pm 34,3$ ng/mL dengan uji *One Way Anova* diperoleh nilai $p=0,001$ ($p<0,05$), menunjukkan terdapat perbedaan signifikan rerata rerata kadar PDGF pada tiap kelompok. Rerata densitas kolagen kelompok (K1) $50,10 \pm 12,33\%$, (K2) $32,75 \pm 6,6\%$, (K3) $33,07 \pm 7,48\%$, (K4) $41,07 \pm 10,8\%$, dan (K5) $41,9 \pm 13,4\%$ dengan uji *One Way Anova* $p=0,088$ ($p<0,05$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan rerata densitas kolagen pada tiap kelompok.

Kesimpulan: pemberian krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) berpengaruh terhadap kadar PDGF dan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB

Kata Kunci: Krim ekstrak kacang kedelai, PDGF, Kolagen, UVB

ABSTRACT

Background: premature aging is caused by excessive activity under sunlight, causing oxidative stress and inflammatory reactions, including premature aging, changing skin structure, including shortening and thickening of collagen fibers, damage to elastic fibers, and changes in the proportion of collagen types in the dermis. The purpose of this study was to determine the effect of giving soybean extract cream (Glycine max (L.) Merr) on PDGF concentration and collagen density in BALB/c mice exposed to UVB light.

Objective: determine the effect of giving soybean extract cream (Glycine max (L.) Merr) on PDGF concentration and collagen density in BALB/c mice exposed to UVB rays.

Method: experimental research Post Test Only Control Group Design using 30 BALB/c mice with 5 treatment groups, namely healthy mice group (K1), Negative group (K2) without UVB exposure, Positive group (K3) exposed to UVB and smeared with vitamin E cream, Treatment group dose of soybean extract cream (KEKD) 10% (K4) and dose of KEKD 20% (K5). Data analysis using One way anova statistical test.

Results: there was a significant difference in the average PDGF levels of group (K1) 149.5 ± 7.1 ng/mL, (K2) 40.4 ± 4.4 ng/mL, (K3) 88.6 ± 41.7 ng/mL, (K4) 323.2 ± 86.1 ng/mL, and (K5) 330.2 ± 34.3 ng/mL with the One Way Anova test obtained a p value = 0.001 ($p < 0.05$), indicating that there was a significant difference in the average PDGF levels in each group. The average collagen density of group (K1) was $50.10 \pm 12.33\%$, (K2) $32.75 \pm 6.6\%$, (K3) $33.07 \pm 7.48\%$, (K4) $41.07 \pm 10.8\%$, and (K5) $41.9 \pm 13.4\%$ with One Way Anova test $p = 0.088$ ($p < 0.05$) indicating no significant difference in the average collagen density in each group.

Conclusion the administration of soybean extract cream (KEKD) affects PDGF levels and collagen density in BALB/c mice exposed to UVB rays

Keywords: Soybean extract cream, PDGF, Collagen, UVB

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penuaan dini diakibatkan aktivitas berlebihan dibawah sinar matahari, menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang ditandai dengan kulit kering, kasar dan keriput.^{1,2} Paparan sinar UV pada kulit menyebabkan stres oksidatif serta reaksi inflamasi, termasuk penuaan dini.^{3,4} Mengubah struktur kulit, antara lain pemendekan dan penebalan serat kolagen, kerusakan serat elastis, dan perubahan proporsi jenis kolagen pada dermis.⁵ Penggunaan produk perawatan kulit berbahan sintetis dapat menyebabkan iritasi kulit seperti terbakar, mengelupas, dan dermatitis.⁶ Memanfaatkan terapi dengan aplikasi topikal menggunakan bahan alami menjadi pilihan karena minim efek samping, murah dan ketersediaannya mudah, dibandingkan dengan bahan sintetis.⁷ Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai antioksidan adalah kacang kedelai. ekstrak kacang kedelai diketahui mengandung *Isoflavon, soyasaponin, fitosterol, lignan, phytic acid* yang diketahui efektif untuk mencegah penuaan dini pada kulit.⁸

Kulit secara estetis merupakan organ yang vital, sehingga photoaging pada kulit merupakan kekhawatiran besar yang tidak dapat diabaikan.^{7,9} Paparan UVB menyebabkan terjadinya kerutan dan hilangnya kekencangan dan elastisitas kulit.¹⁰ *Platelet derived growth factor* (PDGF) salah satu *growth factor* pertama yang dihasilkan sebagai respons terhadap cedera, meningkatkan migrasi dan proliferasi sel, menginduksi respons seluler di seluruh fase proses perbaikan.¹¹ Penelitian menjelaskan bahwa radiasi UVB merupakan karsinogen bagi lingkungan manusia.

Efek karsinogenik UVB menjadi perhatian utama bagi kesehatan manusia. Efek akut utama dari radiasi UVB pada kulit manusia normal terdiri dari peradangan (eritema), penyamaran kulit, dan immunosupresi lokal atau sistemik. Pada tingkat molekuler, radiasi UV menyebabkan kerusakan DNA.¹² Penelitian lainnya menggunakan formulasi krim ekstrak kacang kedelai terbukti aman dan efektif meningkatkan kadar kolagen-I baik secara *in vitro* maupun *ex vivo*. Hasilnya menunjukkan peningkatan jumlah kolagen-I pada fibroblas dan kulit manusia ketika diobati dengan krim yang mengandung ekstrak kedelai.² Laporan tentang penelitian ekstrak krim ekstrak kacang kedelai terhadap konsentrasi PDGF dan kaitanya dengan densitas kolagen secara topikal masih sedikit yang melaporkan, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Harapan mencapai usia lanjut atau berumur panjang bagi semua manusia.¹³ Berkolerasi dengan peningkatan jumlah kejadian photoaging. Photoaging menyumbang sekitar 80% dari efek buruk terkait penuaan.¹⁴ Menurut Profil Kesehatan Indonesia, pada tahun 2010 persentase penduduk lanjut usia penduduknya telah mencapai 7,6%, dan diperkirakan angka ini akan meningkat dua kali lipat menjadi 15,77% pada tahun 2035. Peningkatan ini terjadi seiring dengan bertambahnya usia hidup dari 69,8 tahun pada tahun 2010 lalu diperkirakan 72,4 tahun pada tahun 2035. Dengan demikian, bertambahnya usia semakin memperbaiki kualitas hidup.¹³ Penambahan bahan alami di produk kosmetik kini menjadi tren yang populer di kalangan masyarakat karena diyakini bahan alami dapat memberikan nilai nutrisi pada kulit dengan risiko efek samping yang minimal.³

Penuaan adalah proses yang kompleks dan progresif yang mengarah pada perubahan fungsional dan estetika pada kulit. Kemunduran fungsi biologis dan kemampuan untuk mengelola stres metabolik merupakan salah satu konsekuensi utama dari proses penuaan.^{3,15} Kolagen yang merupakan salah satu struktur paling banyak menyusun lapisan dermis pada kulit dimana kontribusinya lebih dari 70% pada kulit yang mengalami penuaan.¹⁶ Akumulasi ROS (*Radical Oxygen Species*) di lapisan dermis,¹ menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dan menghambat pelepasan *growth factor* seperti PDGF, yang akan menghambat sintesis kolagen, berperan dalam peningkatan sintesis kolagen dengan merangsang *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β).¹⁶ Diharapkan pemberian ekstrak kacang kedelai dapat meningkatkan ekspresi PDGF yang memicu peningkatan *growth factor* dan meningkatkan sintesis kolagen.

Kandungan Isoflavon kedelai, polifenol yang ditemukan dalam kedelai, telah terbukti menunjukkan berbagai sifat fisiologis seperti antioksidan, anti-inflamasi, dan sifat anti-penuaan.⁸ Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui potensi KEKD terhadap konsentrasi PDGF dan densitas kolagen pada mencit yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut: Apakah terdapat pengaruh pemberian krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) terhadap konsentrasi PDGF dan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian KEKD terhadap konsentrasi PDGF dan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB

1.3.2 Tujuan Khusus

- a) Menganalisis pengaruh krim KEKD dosis 10% dan 20% terhadap peningkatan kadar PDGF pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB
- b) Menganalisis pengaruh krim KEKD dosis 10% dan 20% terhadap peningkatan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Leite BA, Bezerra PHA, Stocco B, et al. ²	<i>Biotransformed soybean cream as a new nutraceutical for skin care: collagen stimulation in vitro and ex vivo.</i>	Eksperimental, In Vitro dan ex vivo	Formulasi kosmetik yang diperkaya fitoestrogen yang dibuat dengan menggabungkan ekstrak kedelai biotransformasi (BE) ke dalam matriks seperti krim. Ekspresi kolagen-I dianalisis secara in vitro (sel fibroblas) dan ex vivo (eksplan kulit). Hasilnya menunjukkan peningkatan jumlah kolagen-I pada fibroblas dan kulit manusia ketika diobati dengan krim yang mengandung BE. krim yang berfungsi penuh yang terbukti aman dan efektif meningkatkan kadar kolagen-I baik secara in vitro maupun ex vivo.
Uyar B, Sivrikoz ON, Ozdemir U,	<i>Histological investigation of the effect of soybean (glycine max) extracts on the collagen</i>	Eksperimental, In Vivo	Respon kulit terhadap formulasi kosmetik yang diperkaya fitoestrogen yang dibuat dengan menggabungkan ekstrak kedelai biotransformasi (BE) ke dalam matriks seperti krim.

Dasbasi T, Sacar H. ¹⁷	<i>layer and estrogen receptors in the skin of female rats</i>		Ekstrak kacang kedelai memberikan efek estrogenic positif pada kulit dan pada dosis tinggi meningkatkan ekspresi kolagen.
Bezerra PHA, Stocco B, Bianchi CI, et al. ¹⁸	<i>Soybean extract modified by Aspergillus awamori stimulates a greater collagen-I synthesis in the intracellular matrix of human fibroblasts.</i>	Eksperimen, <i>In vivo</i>	Ekstrak kedelai dengan filtrat enzimatik jamur <i>Aspergillus awamori</i> meningkatkan kandungan Genistein dan Daidzein dalam ekstrak kedelai, tidak menunjukkan sitotoksitas terhadap fibroblas. Ekstrak kedelai yang dibiotransformasi pada 1,33µg/mL mendorong sintesis kolagen-I yang lebih besar dalam matriks intraseluler fibroblas dibandingkan ekstrak non-biotransformasi, sehingga menunjukkan potensi nutrikosmetik yang tinggi, keamanan dan augmentasi kolagen-I yang efektif.
Devi S. ¹⁹	Pengaruh krim EKK Terhadap ekspresi MMP1 dan rasio kolagen dermis tipe I-III (Penelitian Eksperimental pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB)	Experime, <i>In Vivo</i>	Krim ekstrak kacang kedelai dosis 16% menghasilkan penurunan ekspresi MMP-1 dan rasio kolagen tipe I,III secara signifikan pada mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB. ¹⁹

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat teoritis

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan untuk menggunakan ekstrak kacang kedelai sebagai salah satu terapi pada anti-aging, dan juga dapat digunakan untuk pengembangan pengetahuan bagi peneliti selanjutnya sebagai referensi.

1. Memberikan pengetahuan tentang peran KEKD pada aktivitas molekuler dalam menghambat penuaan pada kulit
2. Sebagai sarana pengembangan pengobatan dalam anti-aging yang lebih aman, dan efektif yang telah teruji secara ilmiah.
3. Pengembangan KEKD menjadi salah satu sediaan herbal berstandar untuk anti-aging dapat digunakan sebagai sediaan topical dalam memperlambat penuaan kulit

1.5.2 Manfaat praktis

Dengan penelitian ini, peneliti dapat menerapkan ilmu kedokteran yang telah dipelajari dengan baik. Menambah wawasan dan kemampuan dalam penelitian eksperimental, khususnya:

1. Untuk memperoleh informasi tentang pengaruh KEKD terhadap konsentrasi PDGF dan densitas kolagen
2. Untuk menjadikan bahan referensi dalam pengembangan kosmetik anti-aging dan memajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung khususnya dalam bidang penelitian.

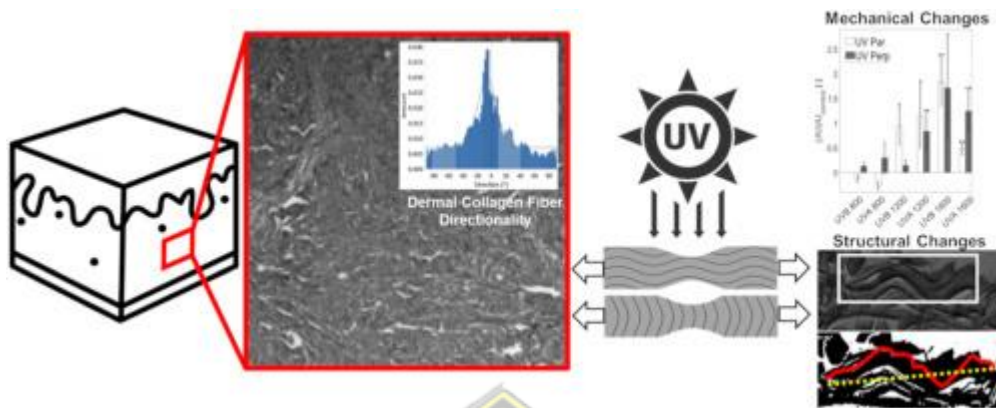
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sinar Ultraviolet (UV)

Penuaan kulit terjadi karena proses internal dan eksternal. Faktor eksternal yang paling berbahaya mengancam kulit adalah radiasi ultraviolet. Radiasi UV terdiri dari tiga komponen antara lain UVA ($\lambda = 320-400$ nm), UVB ($\lambda = 280-320$ nm) dan UVC ($\lambda = 200-280$ nm). Radiasi UVC tidak sama dengan radiasi UVA dan UVB yang dapat mencapai bumi dalam kuantitas yang cukup untuk merusak struktur kulit.²⁰

Radiasi UV dapat menyebabkan kolagen rusak pada tingkat yang lebih tinggi daripada penuaan normal, menembus lapisan tengah kulit (dermis), menyebabkan penumpukan elastin yang tidak normal. Ketika elastin ini menumpuk, enzim diproduksi yang secara tidak sengaja memecah kolagen. Paparan yang terus-menerus hanya mempercepat prosesnya, yang menyebabkan kerutan dan kendur lebih lanjut. Radiasi UVB penyebab utama radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul oksigen tidak stabil yang hanya memiliki satu elektron, molekul harus mengais elektron yang hilang dari molekul lainnya, menyebabkan reaksi berantai yang dapat merusak sel pada tingkat molekuler. Radikal bebas tidak hanya meningkatkan jumlah enzim yang memecah kolagen, tetapi juga dapat mengubah materi genetik sel dengan cara yang dapat menyebabkan kanker.^{21,22}



Gambar 2.1 Perubahan Struktur Kulit Akibat Radiasi UV

Radiasi UV meningkatkan risiko kerusakan jangka panjang seperti.

1. Photoaging

Photoaging mengacu pada kerusakan kulit yang disebabkan oleh paparan sinar matahari yang berkepanjangan, khususnya sinar UVA dan UVB, dan dapat menyebabkan kanker kulit. Sebagian besar perubahan kulit yang terjadi seiring bertambahnya usia dipercepat oleh paparan sinar matahari.

Selama photoaging aktivasi sinyal Smad3 pada keratinosit menginduksi produksi MMP dan sitokin inflamasi, serta rekrutmen neutrofil/makrofag.²³ Ekspresi berlebih TGF- β pada keratinosit basal mengembangkan peradangan kulit kronis yang bergantung pada Smad3 dengan peningkatan regulasi MMP9 dan MMP2, dan infiltrasi neutrofil.²⁴ meningkatkan kadar sitokin inflamasi IL6, IL1 β , dan TNF α serta tingkat keparahan kerusakan kolagen.²⁵

2. Photo immunosupresion

Yaitu obat yang menekan sistem imun atau menurunkan respon tubuh

3. Photocarcinogenesis

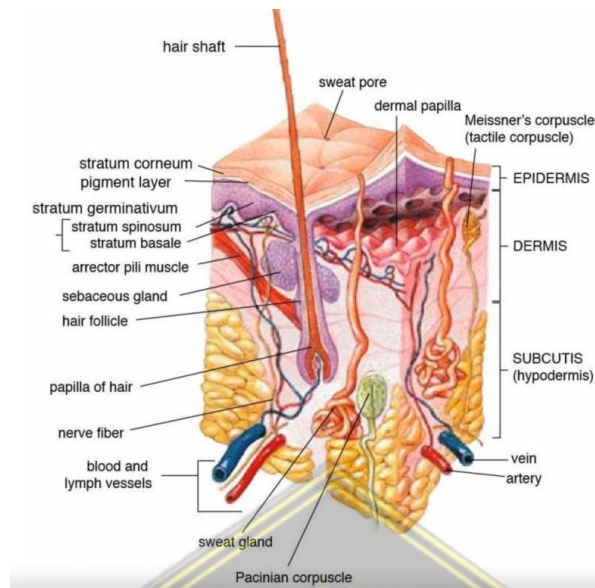
Yaitu endopeptidase ekstraseluler yang aktivitasnya paling banyak dipicu paparan sinar UV dan bertanggung jawab dalam mendegradasi kolagen fibril tipe I dan tipe III pada kulit.

4. Memiliki efek negatif pada keratinosit epidermal dan fibroblas dermal
5. Menginduksi perubahan jangka panjang.
6. Efek berbahaya dari paparan sinar UV terutama meliputi efek samping kulit seperti terbakar sinar matahari.²¹

2.2 Kulit

Kulit manusia adalah organ terbesar dalam tubuh dan penting untuk banyak fungsi, termasuk ekskresi, pengatur panas, hidrasi, pertahanan melawan virus dan racun, dan permulaan produksi vitamin D. Berat kulit pada orang dewasa berkisar antara 2,7 hingga 3,6 kg, dengan luas kurang lebih 1,5 hingga 1,9 meter persegi. Kulit membentuk sekitar 16% dari total berat. Stratum korneum, lapisan keratin dan glikolipid di kulit, berfungsi sebagai penghalang terhadap kehilangan air yang berlebihan. Selain itu, dermicidin, senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh sekresi kelenjar keringat, mencegah kuman menembus permukaan kulit.²⁶

Secara embriologis, kulit tersusun atas dua lapisan: lapisan luar disebut epidermis, yaitu lapisan epitel yang berasal dari ektoderm, dan lapisan dalam disebut dermis atau corium, yaitu lapisan jaringan ikat. yang berasal dari mesoderm.²⁶



Gambar 2.2 Anatomi Kulit Manusia.

2.2.1 Epidermis

Lapisan permukaan kulit yang tipis, yang dikenal sebagai epidermis, bebas pembuluh darah. terdiri dari epitel skuamosa tanduk berlapis yang mengandung Langerhans, Merkel, dan melanosit. Telapak tangan dan kaki mempunyai lapisan epidermis paling tebal, namun ketebalannya bervariasi di seluruh tubuh. Lebih dari 5% dari total ketebalan kulit terdiri dari epidermis. Setiap 4-6 minggu terjadi regenerasi. Setiap 28 hari, epidermis diganti untuk bermigrasi ke permukaan; proses ini bergantung pada usia, lokasi, dan variabel lainnya. Ini adalah satu lapisan sel yang mengandung melanosit. Fungsi epidermis antara lain pigmentasi (melanosit), perlindungan penghalang, struktur sel, pembuatan sitokin dan vitamin D, pembelahan dan mobilisasi sel, serta sel Langerhans.²⁶

Epidermis terdiri atas lima lapisan (dari lapisan yang paling atas sampai yang terdalam):

- a. Stratum Korneum merupakan sel keratinosit yang bisa berganti dan mengelupas.

- b. Stratum Lusidum terdapat pada kulit tebal telapak kaki dan telapak tangan. Tidak tampak pada kulit tipis.
- c. Stratum Granulosum: 3-5 lapisan sel poligonal pipih dengan inti tengah membentuk stratum granulosum. Sitoplasmanya dipenuhi butiran basofilik kasar yang dikenal sebagai butiran keratohialin, yang mengandung protein tinggi histidin. Sel Langerhans juga ada.
- d. Stratum Spinosum: Stratum spinosum mengandung kumpulan filamen yang dikenal sebagai tonofibril; diyakini bahwa filamen ini sangat penting untuk menjaga kekompakan sel dan melindungi dari kerusakan akibat abrasi.
- e. Stratum basale, juga dikenal sebagai stratum germinativum, adalah tempat terdapat banyak aktivitas mitosis dan pembaharuan sel epidermis terjadi secara terus menerus.²⁶

2.2.2 Dermis

Merupakan bagian yang paling penting di kulit. terdiri dari jaringan ikat yang menghubungkan jaringan subkutan dengan epidermis dan memeliharanya. Ada dua lapisan di dermis yaitu lapisan papiler tipis dan memiliki sedikit jaringan ikat di dalamnya dan lapisan tebal jaringan retikuler terdiri dari jaringan ikat padat. Seiring bertambahnya usia, sintesis kolagen kita berkurang dan serat kolagen kita menjadi lebih tebal. Terdapat banyak jaringan pembuluh darah di dermis. Sejumlah turunan epidermis, termasuk kelenjar keringat, kelenjar sebaceous, dan folikel rambut, juga ditemukan di dermis. Jumlah turunan epidermis di dermis menentukan seberapa baik penampilan kulit. Dermis berfungsi sebagai pendukung struktural, sumber nutrisi, kekuatan mekanik, penghalang terhadap gaya geser, dan reaksi inflamasi.²⁶

2.2.3 Subkutis

Merupakan lapisan di bawah dermis atau hipodermis yang terdiri dari lapisan lemak. Lapisan ini terdapat jaringan ikat yang menghubungkan kulit secara longgar dengan jaringan di bawahnya. Jumlah dan ukurannya berbeda-beda menurut daerah di tubuh dan keadaan nutrisi individu. Berfungsi menunjang suplai darah ke dermis untuk regenerasi. Fungsi subkutis/hipodermis adalah sebagai pelekat ke struktur dasar, isolasi panas, cadangan kalori, kontrol bentuk tubuh dan mechanical shock absorber.²⁶

2.3 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

2.3.1 Pengertian

Sekitar pertengahan tahun 1970-an, beberapa peneliti telah menemukan suatu jenis faktor pertumbuhan untuk merangsang sel fibroblas dan sel otot polos yang dapat diperoleh dari trombosit. Faktor pertumbuhan tersebut adalah *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)* dan dimurnikan setelah beberapa tahun oleh Heldin *et al.* *PDGF* adalah dimer dengan berat 30kDa yang terdiri dari rantai A dan rantai B, yang dikode dengan gen dan fungsi yang berbeda. Telah ditemukan dua gen tambahan yang mengkode polipeptida *PDGF-C* dan *PDGF-D*. Sampai saat ini, lima komposisi dimerik telah diidentifikasi sebagai *PDGF-AA*, *-BB*, *-CC* dan *-DD*. Target kerja *PDGF* sangat luas hingga mencakup sel turunan mesoderm seperti fibroblas, perisit, sel otot polos, sel glial, dan sel mesangial. Isoform *PDGF* memiliki dua jenis reseptor tirosine kinase kelas III yang berbeda yaitu *PDGFR α* dan *PDGFR β* . *PDGFR α* mempunyai afinitas tinggi dengan *PDGF-A*, *-B* dan *-C*, sementara *PDGFR β*

berafinitas tinggi dengan *PDGF-B* dan *-D*.²⁷

Penelitian oleh Heldin & Westermark mendapati bahwa homodimer *PDGF-BB* dihasilkan oleh sel ekspresi *PDGF-B* dan hasil tersebut menunjukkan bahwa famili *PDGF* terdiri dari tiga jenis protein yaitu *PDGF-AA*, *PDGF-AB* dan *PDGF-BB* yang dikode oleh dua jenis gen yaitu *PDGF-A* dan *PDGF B*. Namun, setelah 15 tahun, ternyata terdapat dua jenis gen dan protein tambahan yang ditemukan yaitu *PDGF-C* dan *PDGF-D*. Walaupun enzim protease endogen yang berperan dalam aktivasi *PDGF-B* belum diidentifikasi, tetapi trombin merupakan zat potensial dalam merangsang proteolisis ekstraselular. Sel ekspresi *PDGF-B* akan mensekresikan *PDGF-BB* yang mudah larut ke dalam medium ekstraselular.²⁷

PDGF disimpan di dalam trombosit dan dihasilkan oleh sel makrofag, yang mempunyai fungsi untuk meningkatkan jumlah sel mesenkim di dalam luka. Hal ini dapat terjadi melalui dua aktivitas: (1) dengan adanya penumpukan trombosit pada inflamasi, maka trombosit akan melepaskan *PDGF* yang kemudian akan merembes ke jaringan sekitarnya dan berperan sebagai *chemoattractant* untuk mengarahkan sel ke daerah luka; (2) dalam jumlah yang banyak di dalam luka, *PDGF* meningkatkan proliferasi sel. *PDGF* bisa mengatur jumlah sel di dalam jaringan luka dan deposisi matriks ekstraselular. *PDGF* dapat mengaktifasi *TGF-β*, merangsang neutrofil, fibroblas dan sel otot polos, sintesis kolagen dan pengaktifan kolagen.²⁸

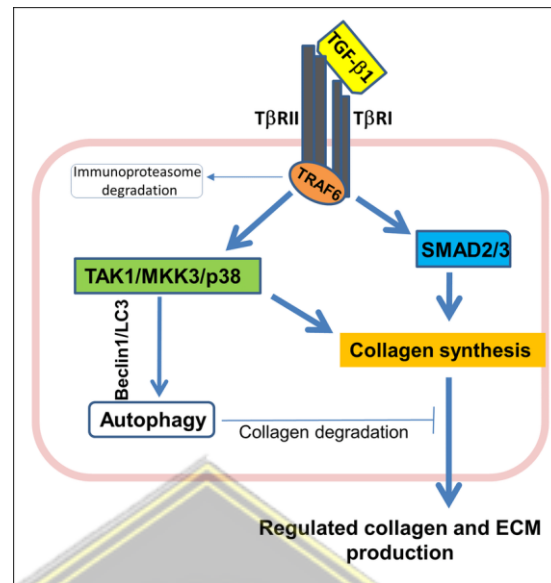
Fungsi spesifik *PDGF* adalah merangsang mitogenesis (peningkatan dalam populasi sel untuk penyembuhan luka), angiogenesis (mitosis sel endotel

di dalam kapiler fungsional) dan aktivasi makrofag (pembersihan daerah luka dan pemicu faktor pertumbuhan sekunder untuk perbaikan jaringan dan regenerasi tulang).^{27,28}

Penelitian dengan aplikasi *PDGF-BB* pada luka insisi didapati dapat meningkatkan ketahanan jaringan luka sebanyak 150%-170% dibandingkan luka tanpa aplikasi *PDGF-BB* serta mampu mengurangi waktu penyembuhan jaringan. Luka yang dirawat dengan *PDGF* menunjukkan peningkatan dalam jaringan granulasi kaya dengan fibroblas, glikosaminoglikan dan peningkatan dalam kadar re-epitelisasi dan neurovaskularisasi jaringan. Maka, bisa disimpulkan bahwa *PDGF* tidak mengubah proses perbaikan jaringan tetapi mempercepat penyembuhannya. *PDGF-BB* juga dapat meningkatkan kecepatan penyembuhan pada pasien dengan kelainan penyembuhan seperti penyakit diabetes.^{28,29}

2.4 Peran PDGF Dalam Sintesis Kolagen

PDGF meningkatkan ekspresi kolagen tipe III dengan menstimulasi faktor pertumbuhan yang dikenal sebagai *Transforming growth factor-β* (TGF-β). Dalam kondisi sehat, TGF-β1 mempertahankan pembentukan dan deposisi matriks ekstraseluler (ECM) yang terkontrol dengan mengontrol sintesis dan akumulasi kolagen. Dalam skenario ini, protein adaptor sinyal nuklir TRAF6 mengaktifkan jalur sinyal positif yang menyebabkan produksi kolagen melalui jalur SMAD2,3 kanonik dan jalur TAK/MKK3/p38 non-kanonik. TAK1/MKK3/p38 terlibat dalam pemecahan kolagen autophagic. TRAF6 dikendalikan oleh degradasi imunoproteasom.³⁰



Gambar 2.3 TGF- β meregulasi sintesis kolagen dan matrix ekstraseluler.

Mediator penting dalam sintesis kolagen dan matriks sel termasuk PDGF dan TGF- β . Melalui interaksinya dengan PDGFR (PDGF-R), reseptor tirosin kinase yang terdiri dari isoform reseptor- α dan reseptor- β , PDGF-BB meningkatkan kontak kolagen. Dimerisasi yang dihasilkan dari pengikatan ligan PDGF dan PDGF-R memicu autofosforilasi beberapa residu tirosin, sehingga memulai jalur sinyal yang mencakup lima isoform PDGF. PDGF-R α dan PDGF-R β hanya dapat diikat oleh PDGF-BB.^{31,32}

Fosfolipase 3'-kinase (PI3K) diinduksi oleh PDGF dalam pergantian aktin, yang menghasilkan stimulasi produksi kolagen, kontraksi sel, dan pertumbuhan in vitro. Seperti PI3K, PDGF meningkatkan Ca^{2+} intraseluler melalui pengaktifan protein kinase C (PKC) dan fosfolipase C γ (PLC γ). Aktivasi PLC γ memicu sinyal kemotaktik, yang pada gilirannya menyebabkan sintesis kolagen dan kontraksi matriks.^{30,32}



Gambar 2.4 Pengaruh Radiasi UV pada Sintesis Kolagen

ROS dihasilkan akibat proses photoaging pada epidermis akibat paparan radiasi sinar UV, khususnya sinar UVB. Peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan memulai pelepasan interleukin-6 (IL-6), yang pada gilirannya menyebabkan ekspresi metalloproteinase (MMPs) yang berlebihan. MMP adalah kolagenase yang bergantung pada seng yang menumpuk di kulit yang menua. Activated Protein-1 (AP-1), faktor transkripsi yang terdiri dari c-Fos dan c-Jun, juga merangsang pengembangan MMP. Dari semua MMP yang diketahui, MMP-1 memulai pemecahan kolagen, sementara MMP-3 mempertahankannya.³³

Matriks ekstraseluler dibentuk oleh sejumlah protein antara lain kolagen dan elastin, yang seluruhnya memainkan peran dalam menjaga elastisitas kulit. Kolagen tipe I adalah protein structural utama dari matriks ekstraseluler dermal dan sintesis dari precursor kolagen tipe I disebut prokolagen tipe I, dipengaruhi oleh TGF-β1. Protein Smad juga berperan dalam sintesis kolagen, dimana mereka berperan

sebagai sinyal transduksi dan factor transkripsi yang meningkatkan sintesis kolagen. Secara spesifik, kompleks Smad2/3 yang teraktivasi diimpor ke dalam nucleus untuk meregulasi transkripsi gen. Sebaliknya, aksis sinyal TGF- β /Smad secara negative diregulasi oleh Smad7 dan dampaknya pada photoaging, radiasi UV mengganggu sinyal TGF- β /Smad melalui peningkatan ekspresi Smad7.³³

2.2.4 Fisiologi kulit

Kulit merupakan organ yang berfungsi sangat penting bagi tubuh diantaranya adalah memungkinkan bertahan dalam berbagai kondisi lingkungan, sebagai barier infeksi, mengontrol suhu tubuh (termoregulasi), sensasi, ekskresi dan metabolisme. Fungsi proteksi kulit adalah melindungi dari kehilangan cairan dari elektrolit, trauma mekanik, ultraviolet dan sebagai barier dari invasi mikroorganisme patogen. Sensasi telah diketahui merupakan salah satu fungsi kulit dalam merespon rangsangan karena banyaknya akhilar saraf seperti pada daerah bibir, puting dan ujung jari. Kulit berperan pada pengaturan suhu dan keseimbangan cairan elektrolit. Termoregulasi dikontrol oleh hipotalamus. Temperatur perifer mengalami proses keseimbangan melalui keringat, *insensible loss* dari kulit, paru-paru. Temperatur kulit dikontrol dengan dilatasi atau kontriksi pembuluh darah kulit. Bila temperatur meningkat terjadi vasodilatasi pembuluh darah, kemudian tubuh akan mengurangi temperatur dengan melepas panas dari kulit dengan cara mengirim sinyal kimia yang dapat meningkatkan aliran darah di kulit. Pada temperatur yang menurun, pembuluh darah kulit akan vasokonstriksi yang kemudian akan mempertahankan panas.²⁶

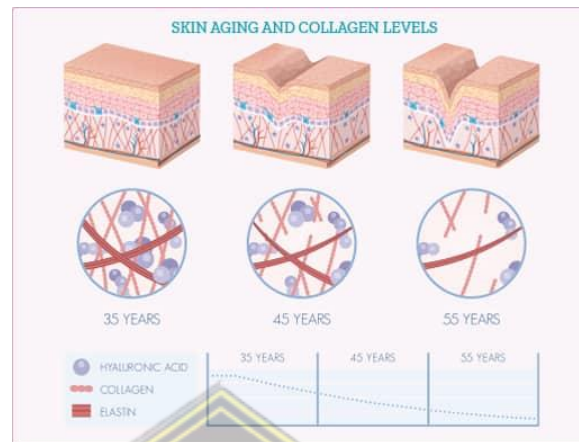
Epidermis memainkan peran penting dalam membatasi penetrasi dalam radiasi UV ke dalam lapisan dermis, yaitu hampir 80% dari radiasi UVC, 62% UVB dan 45% UVA dilemahkan atau direfleksikan oleh lapisan epidermis.²²

2.5 Kolagen

2.5.1 Definisi Kolagen

Kolagen adalah molekul protein yang dibentuk dari asam amino. Kolagen berfungsi memberikan dukungan structural di ruang ekstraseluler jaringan konektif. Oleh karena kekakuan dan resistensi terhadap peregangan, kolagen merupakan matriks yang baik untuk kulit, tendon, tulang dan ligament. Kolagen kemudian dapat dibagi menjadi beberapa kelompok bergantung pada tipe struktur yang dibentuk. Terdapat 28 tipe kolagen yang telah ditemukan, tapi sejauh ini yang paling umum adalah tipe I sampai IV dan kolagen tipe I dijumpai pada 90% tubuh manusia.³⁴

Jenis serat kolagen yang paling umum di tubuh manusia adalah kolagen-I, yang terdapat di tendon, tulang, dan kulit. berperan penting dalam perkembangan jaringan parut di area ini. Tulang rawan mengandung kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, dan kolagen-11. Kulit, pembuluh darah, dan jaringan dengan serat retikuler seperti jaringan yang tumbuh dengan cepat, terutama pada tahap pertama penyembuhan luka semuanya mengandung kolagen-3. Kolagen-7 sebagian besar ditemukan dalam fibril penahan di persimpangan dermal-epidermal di kulit, mukosa, dan leher rahim, sedangkan kolagen-3 didistribusikan serupa dengan kolagen-1. Dinding arteri darah juga kaya akan kolagen-7.³⁵



Gambar 2.5 Kolagen pada kulit seiring pertambahan usia.

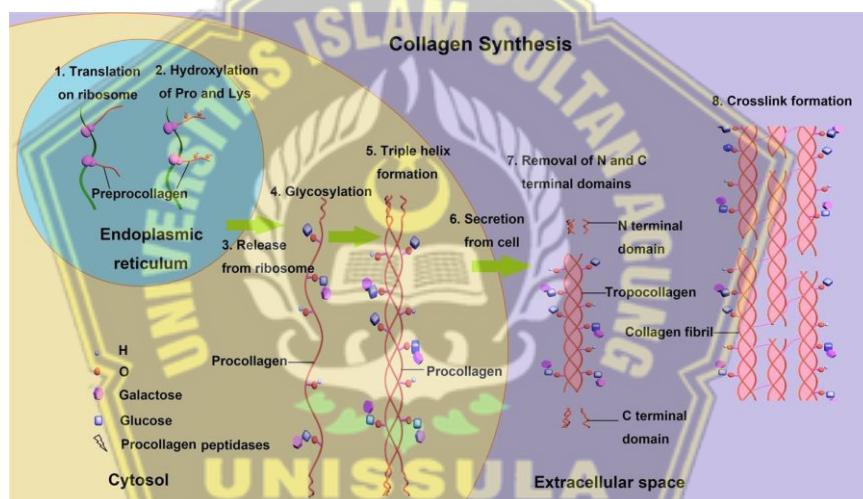
Sejumlah penelitian membuktikan bahwa kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen tipe-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi, pada kulit juga dapat dijumpai kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7 dan kolagen-12 yang ditemukan dalam jumlah sedikit yang dipertimbangkan juga ikut menunjang kulit, namun peran pastinya belum jelas.²¹ Oleh karena kolagen-1 adalah kolagen yang mendominasi organ kulit, maka parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah kolagen-1.³⁵

Kolagen sering kali berkurang seiring bertambahnya usia. Tidak semua bentuk kolagen termasuk dalam kategori ini. Kolagen-3, yang sering terdapat pada jaringan yang berkembang pesat, banyak terdapat pada kulit anak-anak. Kolagen-3 akan berkurang jumlahnya dan kolagen-1 akan lebih banyak selama proses penuaan intrinsik. Sampai usia 35 tahun, kolagen-1 akan meningkat; setelah itu akan jatuh. Meskipun korelasi pasti antara usia dan kandungan kolagen belum diketahui, kulit manusia pada usia tertentu memiliki lebih sedikit

kolagen secara keseluruhan dibandingkan kulit yang berusia lebih dari enam puluh tahun.³⁵

2.5.2 Sintesis Kolagen

Heliks rangkap tiga dihasilkan ketika rantai polipeptida α prokolagen terjatoh dalam sisterna retikulum endoplasma di dalam ribosom yang berasal dari retikulum endoplasma kasar. Glisin adalah asam amino ketiga dalam rantai α . Setelah translasi, dua asam amino minor yang paling umum dalam kolagen, hidroksiprolin dan hidroksilisin, mengalami hidroksilasi.³⁶



Gambar 2.6 Sintesis kolagen.

Sintesis kolagen tipe I meliputi beberapa tingkat sebagai berikut:

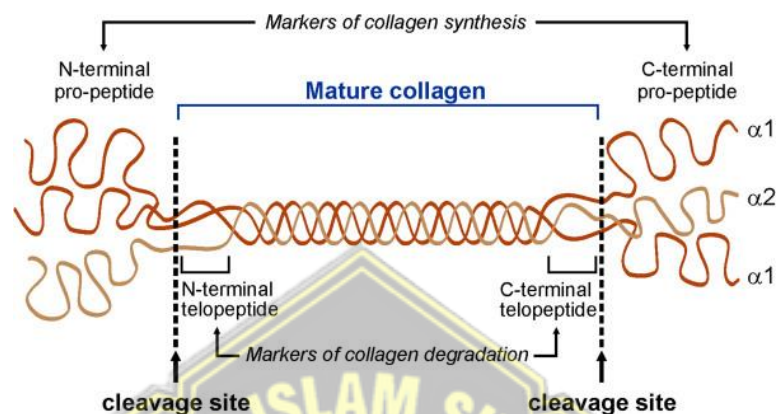
1. Diproduksi dalam ikatan poliribosom, Lipetida rantai α prokolagen menempel pada membran retikulum endoplasma kasar, berpindah ke dalam tangki, dan kemudian dilanjutkan dengan peptida sinyal.
2. Prolin dan lisin mengalami hidroksilasi setelah rantai peptida mencapai panjang minimum yang telah ditentukan dan masih melekat pada ribosom. Prolil hidroksilase dan lisi hidroksilase merupakan enzim yang

menyertainya, dan prosesnya memerlukan O_2 , Fe^{2+} , dan asam askorbat (vitamin C) sebagai kofaktor.

3. Berbagai bentuk kolagen memiliki jumlah ikatan galaktosa-hidroksilisin yang bervariasi akibat glikosilasi pada beberapa residu hidroksilisin.
4. Gugus amino dan karboksil terminal setiap rantai α bergabung untuk menghasilkan polipeptida non-heliks, yang biasa disebut sebagai propeptida yang diperluas, yang membantu pembentukan rantai α (α_1 , α_2) yang tepat menjadi triplehelix. Propeptida non-heliks juga membuat molekul prokolagen larut dan menghentikan pembentukan dan pengendapan fibril kolagen di dalam sel terlalu cepat. Aparat Golgi membawa prokolagen, yang kemudian dieksositosis ke lingkungan ekstraseluler.
5. Prokolagen peptidase, sejenis protease tertentu, mencegah pemanjangan propeptida proses di mana molekul prokolagen menjadi molekul kolagen di luar sel. Berkumpul menjadi fibril kolagen polimer, seringkali di lokasi tertentu dekat permukaan sel.
6. Fibril dari beberapa jenis kolagen bergabung menghasilkan serat. jenis kolagen tertentu (tipe V dan tipe VI) dan proteoglikan.
7. Enzim lisil oksidase mengkatalisis pembentukan ikatan silang kovalen antara molekul kolagen, yang menyatukan struktur fibrilar.³⁷

Rantai α prokolagen mengalami hidroksilasi dan glikosilasi di RER (Retikulum Endoplasma Kasar), membentuk triple heliks. Setelah prokolagen diekspresikan, matriks ekstraseluler adalah tempat berkembangnya fibril. Banyak kelainan yang ditandai dengan kegagalan sintesis kolagen telah

dijelaskan karena variasi gen rantai prokolagen α kecil dan pembentukan kolagen bergantung pada beberapa langkah pasca-translasi yang melibatkan banyak enzim tambahan.³⁸



Gambar 2.7 Struktur molekul kolagen. Pro-kolagen terdiri dari 2 rantai $\alpha 1$ dan 1 rantai $\alpha 2$ yang bergabung menjadi triple helix. Domain pro-peptida pada terminal karboxil dan terminal amino terpisah menghasilkan pembentukan kolagen matur.

Setiap molekul prokolagen dari kolagen tipe I, yang merupakan jenis yang paling umum, terdiri dari dua rantai peptida: $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Satu molekul memiliki massa sekitar 100 kDa, terjalin menjadi heliks di sisi kanan, dan terhubung ke molekul lain melalui interaksi antara ikatan hidrofobik dan hidrogen. Jarak antara setiap putaran heliks penuh adalah 8,6 nm. Setiap molekul tropokolagen memiliki panjang 300 nm dan lebar 1,5 nm.³⁸

2.5.3 Mekanisme Kerusakan Kolagen

Serat kolagen pada kulit yang menua akibat sinar matahari menjadi tidak teratur. Untaian kolagen diperkecil ukurannya dan dihomogenisasi menjadi bundel. Photoaging pada kulit mengakibatkan berkurangnya prekursor kolagen tipe I dan III serta ikatan silangnya. Kolagen tidak menunjukkan perubahan setelah sepuluh minggu paparan UV-B ketika diuji dengan antibodi yang

ditujukan terhadap kolagen tipe I. Setelah 12 minggu paparan sinar UV-B (lima hari seminggu dengan $\frac{1}{2}$ MED setiap paparan), kolagen tipe III mulai meningkat.³⁹

Faktor eksternal dan internal mempengaruhi kolagen. Beberapa contoh pengaruh intrinsik adalah polusi, radiasi UV, dan makanan. Degradasi kolagen yang disebabkan oleh variabel intrinsik dapat diperburuk oleh variabel ekstrinsik. Studi tentang pengaruh variabel keturunan terhadap penuaan kulit di berbagai kelompok etnis menunjukkan pengaruh ini. Orang Amerika keturunan Afrika dan kelompok etnis lain yang memiliki penetrasi kulit gelap lebih terlindungi dari sinar UV. Radikal bebas dihasilkan oleh sinar ultraviolet dan merusak kolagen kulit. Dibandingkan dengan kulit orang Kaukasia, kulit orang Afrika-Amerika memiliki tingkat lipid antar sel yang lebih tinggi, yang membantunya menahan penuaan. Dibandingkan dengan ras Kaukasia, orang Asia memiliki kerutan wajah yang lebih ringan dan berkembang lebih lambat.³⁹

Kolagen kulit yang menua tampaknya penting bagi wanita pascamenopause. Setiap tahun, kadar kolagen kulit orang dewasa turun sebesar 1%. Wanita mengalami penurunan kolagen lebih besar dibandingkan pria. Rusaknya akumulasi kolagen menjadi penyebab kulit kendur dan kerutan di wajah. Selain itu, radikal bebas dihasilkan oleh radiasi ultraviolet dan dapat bereaksi dengan protein seperti kolagen sehingga menyebabkan kerusakan pada protein.^{39,40}

Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa radiasi UV merusak kultur fibroblas. Permukaan keratinosit dan fibroblas diaktifkan oleh sinar ultraviolet

melalui pengikatan faktor pertumbuhan dan reseptor sitokin. Faktor transkripsi AP-1 dan jalur transduksi sinyal keduanya dirangsang oleh reseptor aktif, dan ini mempengaruhi transkripsi gen MMP. AP-1 juga menekan ekspresi gen prokolagen pada fibroblas. MMP mendegradasi kolagen dan protein lain dalam matriks ekstraseluler dermal. Mereka dilepaskan oleh keratinosit dan fibroblas. Integritas struktur dan fungsi matriks ekstraseluler akan terganggu jika cedera kulit tidak diperbaiki sepenuhnya. Paparan sinar matahari yang sering merusak kolagen seiring berjalannya waktu, menyebabkan berkembangnya beberapa kerutan.^{33,41}

2.6 Kacang Kedelai

Kacang kedelai (*Glycine max (L.) Merr*) adalah jenis kacang-kacangan dari famili *Fabaceae*. Kacang kedelai adalah kacang yang paling penting bernilai ekonomis di dunia, mengandung protein nabati dan menjadi bahan ratusan produk kimia. Asal tumbuhan kacang kedelai masih belum sepenuhnya jelas, tetapi banyak ahli botani percaya tumbuhan tersebut tumbuh di Cina sentral pada 7000 BCE. Kacang kedelai telah dimanfaatkan di Cina, Jepang dan Korea selama ribuan tahun sebagai makanan dan komponen obat-obatan. Kacang kedelai dikenalkan ke Amerika Serikat pada tahun 1804 dan menjadi tumbuhan yang penting pada pertengahan abad 20an.⁴²

2.6.1 Taksonomi dan Morfologi

Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Bangsa	: <i>Fabales</i>

Suku : *Fabaceae/Leguminosae*
Marga : *Glycine Willd*
Spesies : *Glycine max* (L.) Merr.



Gambar 2.8 Tanaman Kacang Kedelai.

Tanaman kacang kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). Kedelai merupakan tanaman pangan berupa semak yang tumbuh tegak. Kedelai jenis liar *Glycine ururiensis*, merupakan kedelai yang menurunkan berbagai kedelai yang dikenal sekarang kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). Akar tanaman kedelai terdiri atas akar tunggang, akar lateral, dan akar serabut. Pada tanah yang gembur, akar ini dapat menembus tanah sampai kedalaman 1,5 m. Pada akar lateral terdapat bintil-bintil akar yang merupakan kumpulan bakteri rhizobium pengikat N dari udara. Bintil akar ini biasanya akan terbentuk 15-20 hari setelah tanam, selain sebagai penyerap unsur hara dan penyangga tanaman, pada perakaran merupakan tempat terbentuknya bintil/nodul akar yang berfungsi sebagai pabrik alami terfiksasinya nitrogen udara oleh aktivitas bakteri Rhizobium.⁴³

Kedelai berbatang semak, dengan tinggi batang antara 30-100 cm. setiap batang dapat membentuk 3-6 cabang. Pertumbuhan batang dibedakan menjadi dua tipe, yaitu tipe determinate dan indeterminate. Perbedaan sistem pertumbuhan batang ini didasarkan atas keberadaan bunga dan pucuk batang. Pertumbuhan batang tipe determinate ditunjukkan dengan batang yang tidak tumbuh lagi pada saat tanaman mulai berbunga. Pertumbuhan batang tipe indeterminate dicirikan bila pucuk batang tanaman masih bisa tumbuh daun, walaupun tanaman sudah mulai berbunga. Begitu juga dengan bentuk daun kedelai ada dua macam, yaitu bulat (oval) dan lancip (lanceolate).⁴³

Kedelai biasanya akan tumbuh baik pada ketinggian lebih dari 500 m dpl sehingga tanaman kedelai sebagian besar tumbuh di daerah yang beriklim tropis dan subtropis. Bahkan daya tahan kedelai lebih baik dari jagung. Tanaman kedelai dapat tumbuh baik di daerah yang memiliki curah hujan sekitar 100-400 mm/bulan. Untuk mendapatkan hasil optimal, tanaman kedelai membutuhkan curah hujan antara 100-200 mm/bulan. Kedelai dapat tumbuh pada kondisi suhu yang beragam. Suhu tanah yang optimal dalam proses perkecambahan yaitu 30°C, bila tumbuh pada suhu yang rendah (<15°C), proses perkecambahan menjadi sangat lambat bisa mencapai 2 minggu. Hal ini dikarenakan perkecambahan biji tertekan pada kondisi kelembapan tanah tinggi, banyaknya biji yang mati akibat respirasi air dari dalam biji yang terlalu cepat.⁴³

2.6.2 Kandungan Kacang Kedelai

Komposisi fitokimia dari kacang kedelai sedikit bergantung pada varietas dan lingkungan tumbuhnya tanaman tersebut. Secara umum, kandungan fitokimia utama kacang kedelai dari tinggi ke rendah antara lain: phytic acid (1-2,2%), sterol (0,23-0,46%), saponin (0,17-6,16%), isoflavone (0,1-0,3%) dan lignan (0,02%). Selama bertahun-tahun, penelitian terhadap kacang kedelai untuk efek kesehatan berfokus pada fitokimia isoflavone. Fitokimia lain pada kacang kedelai seperti soyasaponin, fitosterol, lignan, phytic acid dan oligosakarida juga ditemukan memiliki aktivitas biologi.

2.6.2.1 Isoflavon

Isoflavone telah diketahui keberadaannya pada tanaman selama ratusan tahun. Dan kacang kedelai, termasuk makanan yang berasal dari kacang ini, dipertimbangkan memiliki sumber isoflavone paling banyak. Isoflavone (*3-frnil-4H-1-benzopiran-4-one*) adalah subkelas dari flavonoid ubiquinos. Kacang kedelai mengandung tidak flavonoid utama yaitu daidzein (*7,4'-dihidroxiisoflavon*), genistein (*5,7,4'-trihidroxiisoflavon*) dan glicitein (*6-metoksi-7,4'-dihidroxiisoflavone*). Genistein dan daidzein dijumpai dalam konsentrasi yang relative tinggi pada kacang kedelai dan kebanyakan makanan berbahan kedelai.⁴⁴

Efek untuk kesehatan dari isoflavone utamanya dihubungkan dengan aktifitas estrogeniknya. Struktur molekul dari isoflavone, terutama genistein, mirip dengan 17β -estradiol. Isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen isoform α dan β , tetapi afinitas ikatan dengan $Er\beta$ 20 kali

lebih tinggi dibandingkan dengan $E_{17\beta}$. Akan tetapi, dibandingkan dengan estrogen fisiologi seperti 17β -estradiol, isoflavone hamper 100 kali lebih lemah afinitasnya. Efek yang menyerupai estrogen telah dipercaya menjadi salah satu mekanisme kerja isoflavone dalam memberikan efek kesehatan. Mekanisme kerja isoflavone yang kedua, terutama genistein, telah ditemukan bahwa genistein adalah protein tirosin kinase inhibitor. Sejak itulah, isoflavone telah menunjukkan pengaruh besar pada jalur sinyal intraseluler. Genistein dan isoflavone lainnya juga ditemukan berinteraksi dengan $PPAR\alpha/\gamma$. Reseptor nucleus ini diaktifkan oleh asam lemak ($PPAR\alpha$) dan prostaglandin ($PPAR\gamma$) dan berperan sebagai factor transkripsi. Sebagai polifenol, isoflavon juga memiliki aktivitas antioksidan. Akan tetapi, isoflavone bukan antioksidan yang kuat yang dapat melawan oksidan secara langsung. Isoflavone dipertimbangkan sebagai antioksidan karena efeknya pada ekspresi gen enzim yang meningkatkan perlawanan antioksidan. Sebagai tambahan, beberapa mekanisme kerja lain dari isoflavone antara lain menstimulasi/ inhibisi aktivitas enzim yang muncul pada sintesis dan metabolisme steroid, mengatur enzim tiroid peroxidase dan menghambat metastasis kanker.⁴⁴

Isoflavone kacang kedelai memiliki fungsi antara lain antioksidan, fitoestrogenik dan anti inflamasi. Pada penelitian kultur sel dan hewan coba, isoflavone kedelai telah menunjukkan perlindungan terhadap kematian sel, eritema, disfungsi barrier kulit dan penurunan enzim katalase antioksidan alami kulit akibat paparan sinar ultraviolet B. Isoflavone kedelai juga dapat

menurunkan hipermentasi kulit melalui reduksi transfer melanin dari melanosit ke keratinosit. Selanjutnya, protein dan peptide yang berasal dari kedelai telah diteliti pengaruhnya terhadap sintesis protein dimana peptide yang berasal dari kedelai telah menunjukkan kemiripan dengan peptide yang berasal dari kolagen dalam menstimulasi sintesis kolagen di fibroblast dermis.⁴⁵

2.6.2.2 Soyasaponin dan soyasapogenols

Saponin adalah sterol atau triterpene glikosida yang muncul dalam varietas yang luas dari tumbuhan. Makanan yang berbahan dasar kedelai adalah sumber utama saponin. Saponin pada kacang kedelai sering disebut dengan soyasaponin. Mereka berbeda satu sama lainnya berdasarkan tipe aglikon dan posisi dimana rantai glukosa menempel. Secara umum, saponin diklasifikasikan menjadi empat kelompok utama berdasarkan pada struktur aglikon antara lain grup A, B, E dan DDMP. Soyasapogenol adalah aglikon dari soyasaponin. Soyasaponin dapat diperoleh dari hidrolisis asam atau alkali dari soyasaponin. Karena soyasapogenil tidak ada secara alami pada kacang kedelai, mereka hanya terdapat pada produk kedelai melalui proses pengolahan makanan.⁴⁴

Soyasaponin dan soyasapogenol telah dilaporkan menunjukkan efek pada kesehatan antara lain anti-kanker, efek protektif kardiovaskular, anti-virus, aksi hepatoprotektif dan aktivitas antioksidan.⁴⁴

2.6.2.3 Triterpenes dan sterol

Triterpenes dan sterol ditemukan pada minyak kacang kedelai yang tidak dapat disaponifikasi. Keduanya ada dalam kuantitas yang sedikit. Fitosterol telah lama diketahui menurunkan absorpsi kolesterol di intestinal, menyebabkan penurunan kadar kolesterol LDL darah dan menurunkan resiko penyakit kardiovaskular. Selain itu, aktivitas biologi lainnya dari fitosterol juga dilaporkan antara lain efek anti kanker dan modulator imun.⁴⁴

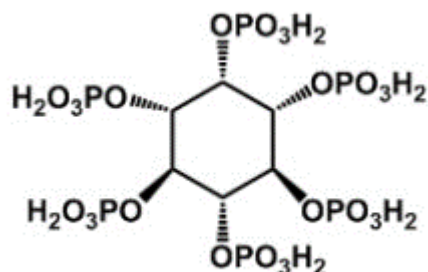
2.6.2.4 Lignans

Lignan dipertimbangkan sebagai kelompok utama lainnya dari fitoestrogen pada kacang kedelai berdasarkan pada struktur kimianya. Lignan diartikan sebagai senyawa dimeric fenilpropanoid (C6-C3), paling banyak terhubung pada 8-8'. Ada tujuh lignan yang diidentifikasi dari kacang kedelai antara lain anhydrosecoisolariciresinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol dan syringaresinol. Lignan mempunyai efek antioksidan dan aktivitas antikanker.⁴⁴

2.6.2.5 Phytate

Phytate, garam dari *phytic acid* (mio-inositol-(1,2,3,4,5,6) *hexakisfosfat*, IP-6, InsP-6) adalah karbohidrat terfosforisasi secara alami. Phytic acid memainkan peranan penting dalam sinyal transduksi, proliferasi dan diferensiasi sel. Phytic acid juga mendapat perhatian karena perannya dalam pencegahan kanker dan mengontrol perkembangan dan metastasis tumor eksperimen. Pada penelitian pada hewan coba, phytic acid

dapat meningkatkan aktivitas sel NK pada tumor kolon yang diinduksi dengan DMH pada tikus.⁴⁴



Gambar 2.8 Struktur kimia *phytic acid*

IP6 sudah diketahui sebagai antioksidan alami sejak lama. Tambahannya, IP6 mempunyai keuntungan signifikan lainnya untuk kesehatan manusia, seperti kemampuan meningkatkan system imun, mencegah kalsifikasi patologi dan pembentukan batu ginjal, menurunkan kolesterol serum dan menurunkan aktivitas platelet patologi. IP6 menghambat replikasi HIV-1 di sel T.⁴⁴

2.7 Efek Ekstrak Kacang Kedelai Pada Penuaan Kulit

Kacang kedelai dimanfaatkan secara luas dalam industri makanan sebagai suplemen dan juga dimasukkan dalam formulasi banyak obat-obatan. Efek positif dari produk kacang kedelai dihubungkan dengan keberadaan isoflavone, senyawa organik yang dihasilkan hamper secara eksklusif oleh jenis kacang-kacangan. Isoflavon kacang kedelai yang paling penting adalah genistein, daidzein dan glicitein. Isoflavon adalah senyawa fitoestrogen yang secara structural mirip dengan steroid estrogenic.⁴⁶

Efek positif isoflavone dari kacang kedelai telah ditemukan memberikan keuntungan pada kulit melalui mekanisme antara lain pencegahan oksidasi lipid, stimulasi proliferasi fibroblas, reduksi degradasi kolagen dan penghambatan enzim 5α -reduktase dan kacang kedelai digunakan secara luas sebagai bahan pembuatan kosmetik. Terlebih kosmetik yang mengandung isoflavone dilaporkan dapat memperlambat penuaan kulit.⁴⁶



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Paparan sinar ultraviolet secara berlebih menimbulkan reaksi peradangan pada kulit.^{47,48} Meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) dalam tubuh, pengaktifan *activator protein-1* (AP-1), meningkatkan matriks metalloproteinase (MMPs) dan menurunkan kolagen dan elastin.⁴⁹ Kolagen yang merupakan salah satu struktur paling banyak menyusun lapisan dermis pada kulit dimana kontribusinya lebih dari 70% pada kulit yang mengalami penuaan.¹⁶

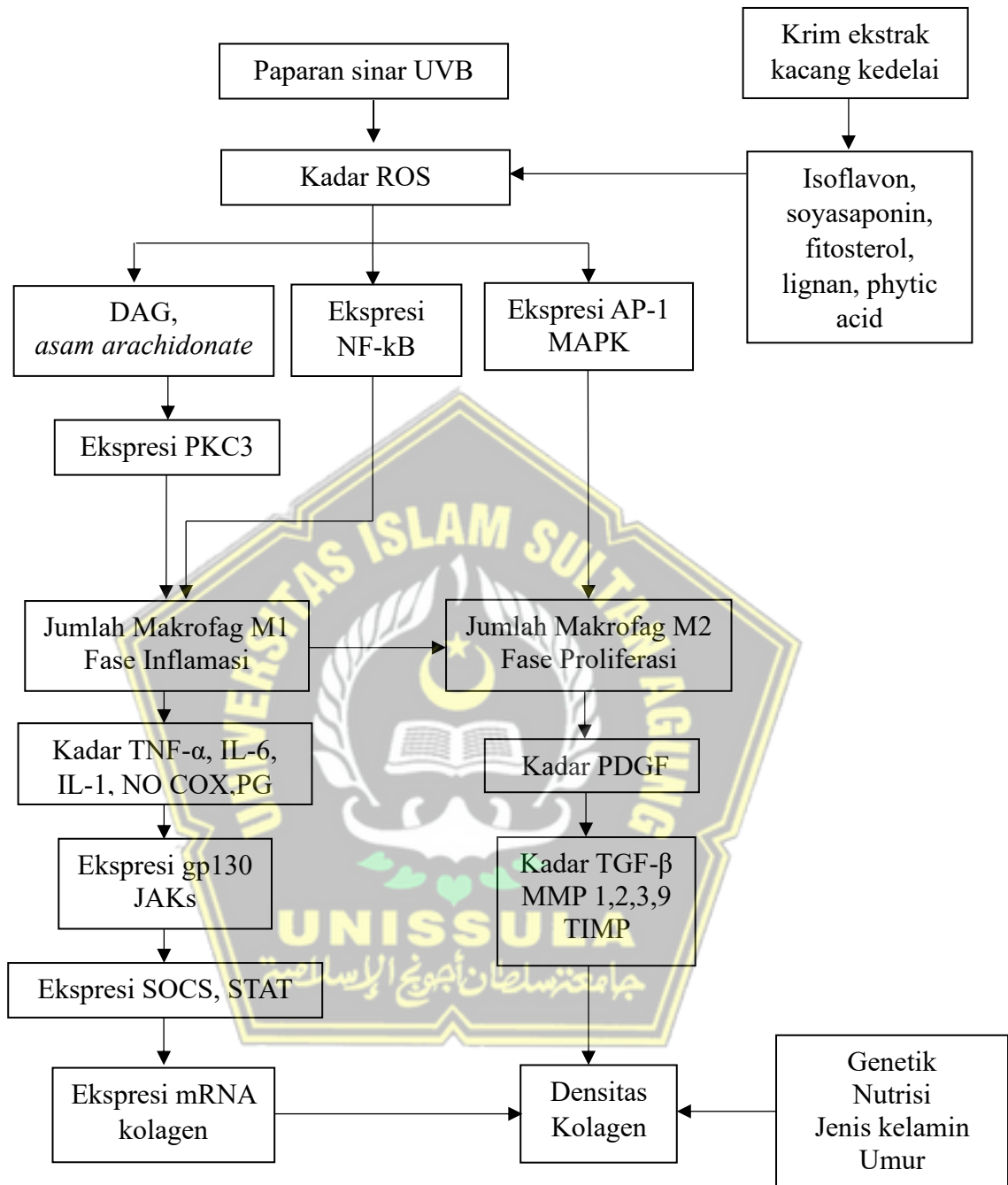
Akumulasi ROS (*Radical Oxygen Species*) di lapisan dermis,¹ menginduksi pelepasan *diacylglycerol* (DAG) dan *asam arachidonate* yang mengaktifkan protein kinase C-3 (PKC3) sehingga menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dan menghambat pelepasan *growth factor* seperti PDGF, yang akan menyebabkan penghambatan sintesis kolagen, PDGF berperan dalam peningkatan sintesis kolagen dengan merangsang *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β).¹⁶ Rangsangan eksternal mengaktifkan sinyal MAPK, mengaktifasi nuklir faktor kappa-beta (NF-kB), dan AP1, peningkatan permeabilitas pembuluh darah, dan kerusakan jaringan melalui masuknya leukosit dengan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan mediator inflamasi lokal.⁵⁰ Produksi sitokin dan mediator proinflamasi seperti interleukin IL-1, IL-6, TNF-α, *nitric oxide* (NO), *cyclooxygenase* (COX), dan prostaglandin (PG).²⁴

Radiasi UVB menginduksi sitokin proinflamasi, sel-sel ini mengeluarkan metalloproteinase (MMPs) dan enzim lain yang merusak matriks kulit.⁵¹

Makrofag yang aktif dalam fase inflamasi (M1) mengalami peralihan fenotipik menjadi fenotipe M2 anti inflamasi dan reparatif. Peralihan ini diatur secara ketat oleh sitokin dan molekul lain, Makrofag M2 mengaktifkan fibroblas untuk menghasilkan faktor pertumbuhan yang merangsang proliferasi dan migrasi keratinosit.⁵² Peningkatan regulasi ekspresi dan peradangan MMP disekresikan oleh keratinosit dan fibroblas, Selain itu, sebagai penghambat alami MMP, penghambat jaringan metalloproteinase (TIMP) mengatur aktivitas MMP, oleh karena itu, tingginya ekspresi MMP pada kulit akibat photoaging mungkin menjadi penyebab utama hilangnya elastisitas kulit dan terbentuknya kerutan, regulasi jalur yang terkait dengan MMP atau peningkatan regulasi ekspresi TIMP merupakan target utama respons photoaging kulit yang disebabkan oleh radiasi UVB.⁵³

Transduksi sinyal sitokin pro inflamasi oleh aktivator transkripsi (STAT) melalui STAT3 menginduksi homodimerisasi gp130 dan fosforilasi JAKs. Penekan sinyal sitokin (SOCS) dan penghambat protein STAT menginduksi produksi kolagen. IL-6 menginduksi ekspresi mRNA prokolagen melalui fosforilasi JAK, kinase yang diatur sinyal ekstraseluler dan protein kinase yang diaktifkan mitogen, meningkatkan TGF- β , yang merupakan penginduksi kuat produksi kolagen. meningkatkan sintesis TIMP-1 melalui fosforilasi STAT3, menghasilkan akumulasi kolagen.⁵⁴

Dari mekanisme diatas, maka disusun kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori

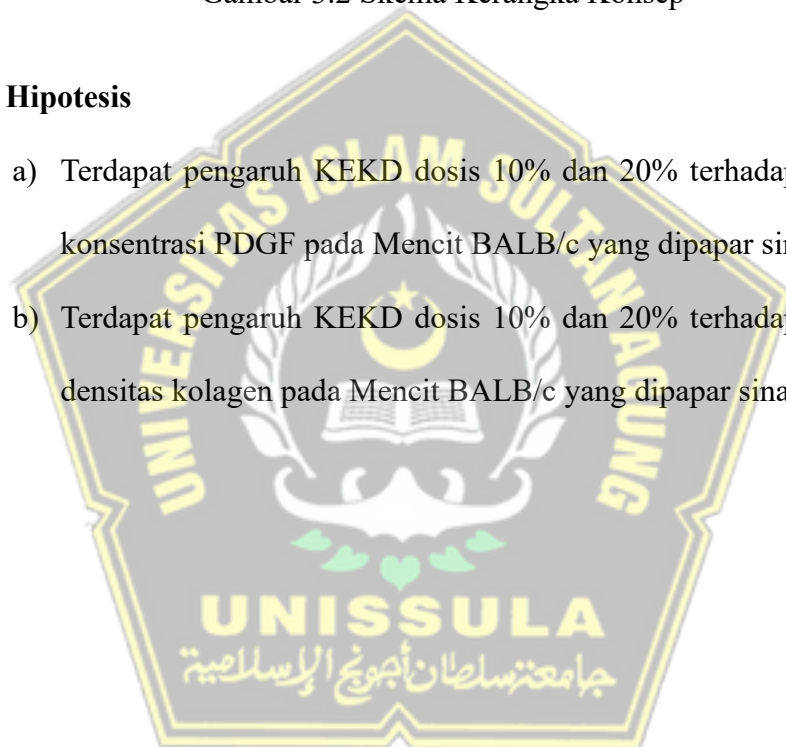
3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Skema Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

- a) Terdapat pengaruh KEKD dosis 10% dan 20% terhadap peningkatan konsentrasi PDGF pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB
- b) Terdapat pengaruh KEKD dosis 10% dan 20% terhadap peningkatan densitas kolagen pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB

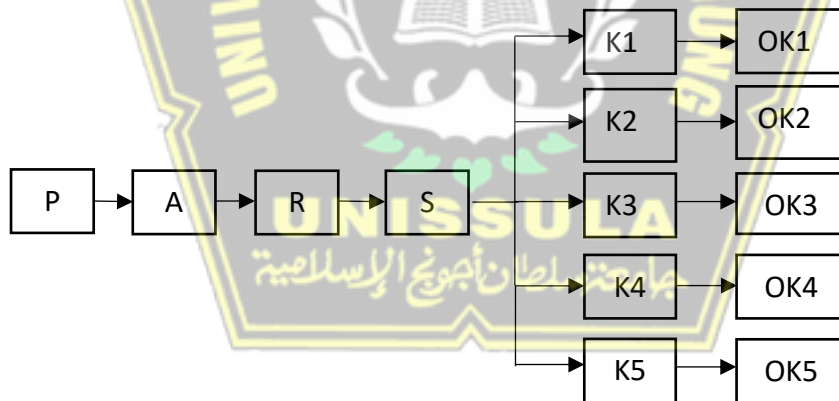


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *True Experimental* dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group* dimana analisis penelitian diamati setelah perlakuan selesai dilaksanakan, metode rancangan acak menggunakan subjek mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB. Penelitian ini menggunakan subjek mencit berjumlah 33 ekor mencit yang dibuat menjadi 5 kelompok, ditambah kelompok validasi sebanyak 3 ekor mencit untuk konfirmasi perlakuan yang dipapar UVB 2 ekor dan 1 ekor tanpa dipapar UVB, dengan rancangan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

- P = Populasi
- A = Adaptasi
- R = Randomisasi
- S = Sampel
- O = Observasi/Pengamatan

- a. KV (Kelompok validasi) Mencit dengan paparan sinar UV-B (2 ekor mencit) dan (1 ekor mencit tanpa paparan UVB) tanpa intervensi selama 7 hari,
- b. K1 (Kelompok Sehat) Mencit tanpa perlakuan diberikan pakan standar selama 14 hari,
- c. K2 (Kelompok Negatif) Mencit dengan paparan sinar UV-B dan diberikan basis krim selama 14 hari,
- d. K3 (Kelompok Positif) Mencit dengan paparan sinar UV-B dan diolesi krim vitamin E selama 14 hari,
- e. K4 (Kelompok perlakuan 1) Mencit dengan paparan sinar UV-B dan diolesi KEKD dosis 10% selama 14 hari,
- f. K5 (Kelompok perlakuan 2) Mencit dengan paparan sinar UV-B dan diolesi KEKD dosis 20% selama 14 hari,

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Subjek penelitian ini adalah Mencit BALB/c betina berusia 6-8 minggu, dengan berat 18-35gram, dinyatakan memenuhi syarat untuk penelitian oleh dokter hewan dari *animal house integrated biomedical laboratory*, FK Unissula Semarang. Mencit dipelihara di ruangan dengan ventilasi cukup, pada suhu ruang berkisar 28- 32°C di laboratorium dan diberi pakan normal. Sebelum perlakuan, mencit diaklimatisasi dalam kandang selama 7 hari.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah mencit yang dipapar sinar UVB dengan

kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi.

4.2.2.1 Kriteria inklusi

- a) Mencit BALB/c betina,
- b) berusia 6-8 minggu,
- c) Berat badan berkisar 18-35 gram

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- a) Terdapat kelainan anatomis,
- b) Mencit yang sakit.

4.3 Besar Sampel

Uji *in vivo* pada penelitian ini, dengan jumlah mencit yang digunakan pada setiap kelompok dihitung menggunakan Rumus $(n-1)(t-1) \geq 15$, (n)=jumlah pengulangan, (t)=jumlah kelompok, dengan hasil $n \geq 5$. Jadi masing-masing kelompok terdiri dari 6 mencit atau 6 kali pengulangan. Sampel diambil dari populasi berjumlah 30 ekor, besarnya ditentukan berdasarkan rumus Federer.

Banyak Kelompok : 5 kelompok (t=)

Sampel tiap kelompok : $(n-1)(t-1) \geq 15$

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

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

$$4 \times 4 \geq 15$$

$$n \geq (15+4)/4$$

$$n \geq 4,75$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah mencit 4,75 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor mencit perkelompok. Setiap kelompok akan ditambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan apabila ada sampel yang *drop out*, dengan total keseluruhan berjumlah 30 ekor Mencit BALB/c.

4.4 Variabel dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Dosis krim Ekstrak kacang kedelai 10% dan 20%
2. Variabel Prakondisi
Mencit yang dipapar sinar UV-B
3. Variabel perantara
Konsentrasi PDGF
4. Variabel terikat
Densitas kolagen

4.4.2 Definisi Operasional

4.4.2.1 Ekstrak Kacang kedelai (*Glycine max (L.)*)

Ekstrak Kacang kedelai adalah krim ekstrak biji kacang kedelai menggunakan pelarut etanol yang dibuat sediaan krim dengan konsentrasi 10% dan 20%. Pada biji kacang kedelai diketahui mengandung antioksidan yang tinggi. Hasil ukuran mg dengan skala ordinal.

4.4.2.2 Konsentrasi PDGF

Konsentrasi PDGF adalah jumlah konsentrasi PDGF pada jaringan kulit sampel mencit setelah perlakuan dengan paparan UVB dan diberikan krim kacang kedelai. Jumlah kadar dianalisis dengan metode ELISA. Hasil pengukuran dengan satuan pg/mL dan skala ukuran rasio.

4.4.2.3 Densitas Kolagen

Protein matriks ekstraseluler, yang tampak biru pada pewarnaan *Masson Trichrome* sebuah teknik untuk memperkirakan kolagen menggunakan program komputer ImageJ dihasilkan oleh fibroblas yang teraktivasi pada hari ke 15 setelah dimulainya terapi. mengukur hasil menggunakan skala pengukuran rasio dan unit ekspresi relatif.

4.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Semarang, Jawa Tengah. Penelitian dilakukan pada Juni-Juli 2024.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Pisau cukur, drum pemaparan, drum pemeliharaan, tempat minum tikus, gunting rambut, vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, pelubang biopsi 6 mm, centrifuge, mikropipet, ujung mikropipet 1000 μ L, dan tabung vial 1,5 mL. Sinar UV (broadband dengan emisi puncak pada 302 nm) dengan energi 180 mJ/cm². Pembaca pelat mikro, mikroskop, toples pewarna, kaca meja berlapis, kaca

penutup, dan laptop adalah beberapa instrumen yang digunakan dalam analisis data.

4.6.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Ketamin
- Xylazine
- Etanol
- Aquades
- Kloroform
- Primer PDGF

4.7 Cara Penelitian

4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diajukan ke Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.7.2 Cara Pembuatan Ekstrak Kacang Kedelai

Setelah 100 g biji kedelai direndam dalam air mendidih dengan NaHCO_3 1% selama satu jam, kulit arinya dibuang, bijinya dicampur dengan 500 mL etanol 70%, disaring, dan sisa ampasnya diekstraksi kembali menggunakan 500 mL larutan 70. % etanol. Setelah diperoleh hasil filter, airnya dihilangkan dengan cara liofilisasi dan evaporasi berputar hingga diperoleh ekstrak kering.

4.7.3 Pembuatan Sediaan Krim Ekstrak Kacang Kedelai

Bahan-bahan dalam fase minyak meliputi asam stearat, isopropyl palmitate, setil alkohol, propil paraben dan sorbitan monostearat (fase 1)

dicampurkan dalam cawan penguap lalu dipanaskan pada suhu 80°C hingga mencair dengan menggunakan waterbath. Metil Paraben, larutan sorbitol 70% polisorbat 60 (fase II) dilarutkan dalam aquades yang telah dipanaskan pada suhu 80°C dalam breaker gelas. Campuran fase air tersebut diaduk hingga larut sempurna menggunakan batang pengaduk. Campuran fase minyak dan fase air dimasukkan ke dalam alat homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ekstrak kacang kedelai dimasukkan ke dalam basis tersebut pada suhu 45°C kemudian dibiarkan pada suhu kamar. Krim yang sudah jadi dimasukkan ke dalam wadah.

Tabel 4.1 Formula untuk basis *Vanishing cream*

Bahan	Berat	
	4%	8%
Ekstrak Kacang Kedelai	4	8
Asam stearat	4.0	4.0
Asetil alkohol	3.0	3.0
Isopropil palmitat	4.0	4.0
Metil paraben	0.1	0.1
Propil paraben	0.05	0.05
Sorbitan Monostearat	0.3	0.3
Larutan Sorbitol 70%	3.0	3.0
Polisorbet 60	2.7	2.7
Aquades ad	100	100

4.7.4 Penetapan Dosis

Dosis krim ekstrak kacang kedelai yang digunakan pada penelitian ini adalah 10% dan 20% dimana pada penelitian sebelumnya, dosis tersebut menunjukkan stabilitas yang baik pada pengamatan organoleptis, pH, ukuran globul, viskositas dan hasil uji *cycling*.⁵⁵

4.7.5 Penyinaran UVB dan Perlakuan pada Subjek Penelitian

1. Setelah adaptasi selama seminggu, mencit diberi kombinasi xylazine (20 mg/kgBB) dan ketamine (60 mg/kgBB) untuk menginduksi anestesi.
2. Rambut punggung mencit dicukur hingga bersih.
3. Selama lima hari, punggung mencit dipaparkan sinar UV (broadband, emisi puncak 302 nm) selama kurang lebih 8 menit setiap hari dengan dosis eritema minimal (MED) 160 mJ/cm².
4. Kemudian mencit diberi perlakuan secara topikal dengan menggunakan krim ekstrak kacang kedelai sebagai berikut:
 - a) Kelompok KI kelompok sehat mencit tanpa perlakuan selama 14 hari,
 - b) Kelompok K2 kelompok negatif diberikan basis krim selama 14 hari,
 - c) Kelompok K3, kontrol positif, diberikan krim vitamin E selama 14 hari
 - d) Kelompok K4 kelompok perlakuan 1 mencit diolesi KEKD dosis 10% selama 14 hari,
 - e) Kelompok K5 kelompok perlakuan 2 mencit diolesi KEKD dosis 20% selama 14 hari,

4.7.6 Validasi Penurunan Kolagen Menggunakan Pengecatan Kolagen

Pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan *Mason Trichrome*, hasil preparat dianalisa oleh ekspertis patologi anatomi dengan tahapan sebagai berikut:

1. Deparafinisasi slide jaringan

2. Setelah memanaskan cairan Bouin hingga suhu antara 54-64°C, inkubasi slide di dalamnya selama 60 menit, lalu biarkan dingin selama sepuluh menit.
3. Bilas dengan air mengalir, Inkubasi slide hematigoksin besi Weigert selama 5 menit
4. Setelah membilas kaca objek dengan cepat, diamkan dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit. Setelah dibilas dengan air, inkubasi selama sepuluh sampai lima belas menit dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat.
5. Setelah 5 sampai 10 menit inkubasi dalam larutan Aniline Blue, bilas kaca objek dengan air. Selama tiga sampai lima menit, slide diinkubasi dalam larutan asam asetat. Setelah kering, slide diletakkan di atas deg glass.

4.7.7 Pengambilan Sampel Jaringan

Pada hari kelima belas setelah dimulainya terapi, sampel jaringan dikumpulkan. Sebelum jaringan apa pun diekstraksi, semua mencit ditidurkan dengan cara dislokasi serviks. Dengan menggunakan biopsi 6 mm pada area kulit yang terkena sinar UVB, jaringan diangkat. Untuk fiksasi, sampel jaringan direndam dalam formalin 10% selama sehari penuh, kemudian jaringan dipindahkan ke dalam tabung berisi alkohol 70% dan disimpan pada suhu kamar hingga dilakukan prosedur preparasi parafin.

4.7.8 Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi

Untuk mengeluarkan cairan dari jaringan, rendam potongan jaringan dalam alkohol 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96% (bergradasi). Setelah satu jam dalam larutan alkohol-xylol, masukkan jaringan 2x2 dalam larutan xylol murni.

2. Parafinisasi dan Embedding

Rendam jaringan selama 2x2 jam dalam parafin cair. Jaringan di dalam parafin diiris dengan mikrotom hingga ketebalan 4 mikron setelah parafin mengeras. Fragmen jaringan yang dihasilkan ditempelkan pada benda kaca menggunakan polisisin yang ditempelkan di atasnya sebagai perekat terlebih dahulu. Jaringan dipanaskan hingga suhu 56–58 derajat Celcius pada kaca objek yang telah dideparafinasi dalam inkubator hingga parafin meleleh.

4.7.9 Prosedur Pengamatan Kepadatan Kolagen

Pengukuran terhadap kepadatan serat kolagen dilakukan dengan mengamati preparat histologi pada perbesaran 400x. Pengukuran dilakukan pada 3 lapang pandang yang berbeda menggunakan kamera yang terpasang pada mikroskop. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* 1.8.0. Seluruh gambar yang diamati dikondisikan dalam keadaan seidentik mungkin. Pengukuran diawali dengan menetapkan skala yang sesuai pada aplikasi *ImageJ* 1.8.0, kemudian pemisahan warna merah, hijau, dan biru dilakukan dengan *plugin color deconvolution* menggunakan vektor MT. Area yang akan diukur berupa warna hijau dan diseleksi dengan menyesuaikan ambang warna tersebut hingga seluruh area yang diinginkan terblok dengan warna merah. Kemudian,

dilakukan pengukuran melalui menu “*measurement*” untuk mengukur wilayah tersebut dalam persentase area. Analisis dilakukan oleh ekspertis patologi anatomi untuk penentuan hasil.

4.7.10 Pengukuran kadar PDGF Menggunakan Metode ELISA

Sampel jaringan kulit yang sudah diperoleh kemudian dianalisis kadar PDGF menggunakan metode ELISA. Analisis ELISA PDGF dilakukan dengan mengikuti prosedur yang dilampirkan dalam produk. Pembacaan kadar PDGF menggunakan microplater reader pada panjang gelombang 450nm. Tahapan pemeriksaan ELISA:

1. Pembuatan standard
Sepuluh sumuran pada mikroplate disiapkan untuk standard, Ditambahkan *Capture* antibodi pada tiap sumuran, dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.
2. Persiapan wash solution: larutkan wash solution 30x dengan aquadest (1 ml wash solution ditambahkan 29 ml aquadest).
3. Setelah cairannya dibuang, cucilah sumur sebanyak lima kali menggunakan larutan pencuci tahap ketiga. Ditambahkan *blocking buffer*, untuk membuat antigen pada sampel menempel pada plate.
4. Sumur dapat dibiarkan semalaman pada suhu 4°C atau selama 60 menit pada suhu 37°C. Tempatkan 40 ul sampel pengencer dan 10 ul sampel itu sendiri ke dalam masing-masing sumur. Sampel harus dimasukkan langsung ke dasar sumur. Selanjutnya sampel dan sampel pengencer dicampur seluruhnya dengan cara diaduk.

5. Setelah mendinginkan cawan pada suhu kamar selama 120 menit, isi setiap lubang dengan 100 μ l antibodi yang terbiotinilasi. Piring dapat dibiarkan semalaman pada suhu 4°C atau selama 60 menit pada suhu 37°C. Setelah cairannya dibuang, cucilah sumur sebanyak lima kali menggunakan larutan pencuci tahap ketiga.
6. Tambahkan 100 μ l ABC solution pada tiap sumuran. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
7. Setelah mengeluarkan cairan dari sumur, cucilah lima kali menggunakan larutan pencuci tahap ketiga. Selanjutnya, isi setiap sumur dengan 90 μ l TMB dan 90 μ l konjugat HRP. Piring harus diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
8. Masing-masing sumur kemudian diisi dengan 100 μ l stop solution sehingga menyebabkan warnanya berubah dari biru menjadi kuning. Selanjutnya, gunakan ELISA reader untuk membaca nilai kepadatan optik (OD) pada 450 nm. Selanjutnya, akan didapatkan nilai OD dari sampel.

4.8 Analisa Data

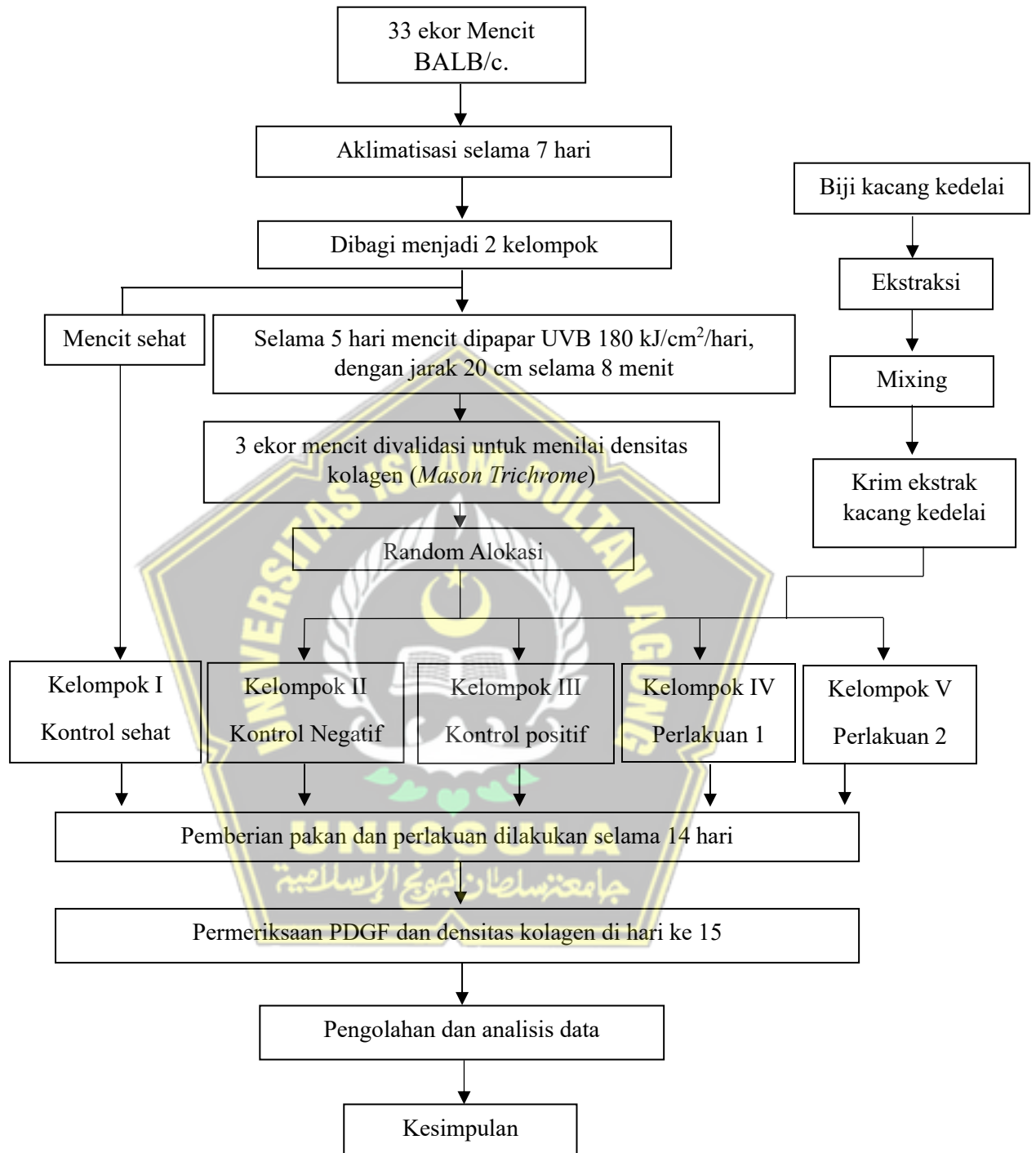
Hasil data pada penelitian dilakukan uji deskriptif yaitu normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* (Jumlah sampel < 50) dan uji homogenitas data dengan uji *Levene test*, Hasil uji deskriptif yang diperoleh dilakukan uji parametrik. Data hasil penelitian didapatkan normal dan sebaran data homogen ($P > 0,05$), dilakukan uji beda *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui dosis yang paling berpengaruh.

Data hasil penelitian didapatkan normal dan sebaran data tidak homogen ($P > 0,05$), dilakukan uji beda *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan

antar kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc temhane* untuk mengetahui dosis yang paling berpengaruh. Keputusan untuk diterima atau ditolak hipotesis penelitian berdasarkan α 5 % dan analisis serta olah data menggunakan aplikasi SPSS 26.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

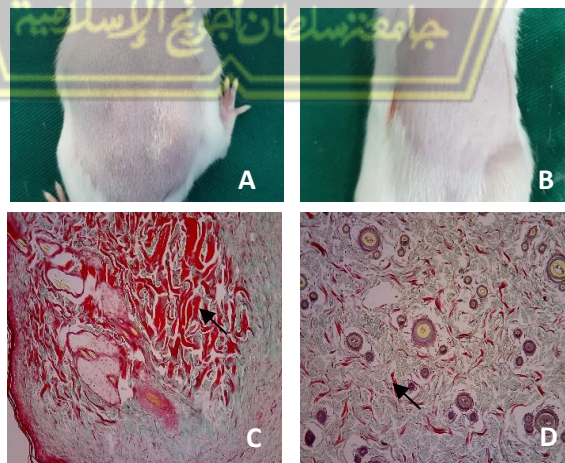
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi Mencit Model Kerusakan Kulit akibat Paparan UVB

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang Jawa Tengah, bertujuan untuk mengevaluasi efek krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) terhadap kadar PDGF dan densitas kolagen pada 30 ekor mencit betina Balb/c. Sebelum aplikasi krim, mencit dipaparkan sinar UVB dengan dosis minimal 1 MED dari jarak 20 cm selama 8 menit, sebanyak 5 kali seminggu. Pengamatan visual dilakukan untuk mendeteksi kemunculan kerutan akibat paparan UVB. Hasil pengamatan validasi menunjukkan bahwa kerutan lebih jelas terlihat pada mencit yang terpapar UVB dibandingkan dengan yang tidak terpapar, seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 5.1. Analisis anatomi menunjukkan penurunan ekspresi elastin setelah paparan, sebagaimana terlihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Secara makroskopis terlihat tidak terdapat kerutan pada mencit yang tidak terpapar UVB (A) dibandingkan dengan yang terpapar UVB (B). Densitas elastin yang terlihat sebagai warna merah (panah hitam) lebih tinggi pada kelompok tanpa paparan UVB (C), dibanding dengan kelompok dengan paparan UVB (D)

Kelompok mencit yang telah tervalidasi mengalami penurunan elastin pasca paparan UVB dibagi menjadi lima kelompok perlakuan sebagai berikut: mencit sehat tanpa paparan UVB digunakan sebagai kelompok kontrol sehat (K1); kelompok Kontrol Negatif (K2) diberikan sinar UVB dan diberi basis krim; kelompok Kontrol Positif (K3) diberikan sinar UVB dan diberi krim Vitamin E; kelompok perlakuan 1 dan 2 (K4 dan K5) diberi sinar UVB dan diberi KEKD dengan dosis masing-masing 10% dan 20%. Pemberian perlakuan dilakukan setiap hari selama 14 hari dan pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-15. Jaringan kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer dengan penambahan protease inhibitor. Setelah jaringan membentuk suspensi, dilakukan sentrifugasi dan supernatant dikumpulkan untuk analisis kadar PDGF dan densitas kolagen menggunakan metode ELISA.

5.1.2 Kadar PDGF

Hasil analisis kadar PDGF ditunjukkan pada tabel 5.1. Berdasarkan hasil analisis ditemukan bahwa kelompok Sehat (K2) memiliki kadar PDGF terendah ($40,4 \pm 4,4$ pg/mL) yang kemudian diikuti oleh K3 ($88,6 \pm 41,7$ pg/mL), K1 ($149,5 \pm 7,1$ pg/mL), dan K4 ($323,3 \pm 86,05$ pg/mL) sementara kelompok K5 memiliki kadar PDGF tertinggi ($330,2 \pm 34,3$ pg/mL). Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengevaluasi normalitas distribusi data kadar PDGF di setiap kelompok. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa distribusi data kadar PDGF dalam kelima kelompok tersebut memenuhi asumsi normalitas ($P > 0,05$). Kelima kelompok, uji homogenitas varians data dilakukan dengan menggunakan uji *Levene*, dan hasilnya

menunjukkan bahwa nilai $P < 0,05$ yang menunjukkan data bersifat tidak homogen.

Tabel 5.1 Data Hasil Analisis Kadar PDGF

VARIABEL	Kelompok					P
	K1 (ng/mL)	K2 (ng/mL)	K3 (ng/mL)	K4 (ng/mL)	K5 (ng/mL)	
PDGF	149,5	40,4	88,6	323,2	330,2	
Standar Deviasi	7,1	4,4	41,7	86,1	34,3	
<i>Shapiro wilk</i>	0,49	0,68	0,82	0,88	0,25	
<i>Lavene test</i>						0,001
<i>One Way Anova</i>						0,001

Keterangan :

**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

**Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

**One way anova* ($p < 0,05$ = signifikan)

Kelima kelompok, dilakukan uji statistik parametrik. Uji yang digunakan adalah *One Way ANOVA*, yang menunjukkan hasil $P < 0,05$, sebagaimana terlihat pada tabel 5.1. Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dalam kadar PDGF. Mengidentifikasi perbedaan antar kelompok, dilakukan uji lanjut *Post hoc Tamhane*, lihat Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Perbedaan rerata kadar PDGF antar dua kelompok dengan *Uji Post hoc Tamhane*

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,001*	0,261	0,100	0,002*
K2	0,001*	-	0,465	0,018*	0,001*
K3	0,261	0,465	-	0,017*	0,001*
K4	0,100	0,018*	0,017*	-	1,000
K5	0,002*	0,001*	0,001*	1,000	-

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

Hasil uji *post hoc tamhane* rerata kadar PDGF menunjukkan bahwa K1 berbeda signifikan dengan kelompok K2 dan K5, kelompok K2 berbeda signifikan dengan kelompok K4 dan K5, K3 berbeda signifikan dengan kelompok K4 dan K5, K4 berbeda signifikan dengan kelompok K2 dan K3, dan K5 berbeda signifikan dengan kelompok K1, K2, dan K3 ($p < 0,05$). Pemberian KEKD pada kelompok K4 dan K5 berbeda signifikan dibandingkan kelompok K3 yang diberikan intervensi vitamin E.



Gambar 5.2 Grafik rerata kadar PDGF pasca pemberian krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) pada mencit yang terpapar UVB

5.1.3 Densitas Kolagen

Data analisis densitas kolagen yang ditampilkan dalam Tabel 5.2 menunjukkan bahwa K2 dan K3 memiliki densitas kolagen terendah yaitu $32,75 \pm 6,6 \%$ dan $33,07 \pm 7,48 \%$, sedangkan kelompok K4 dan K5 memiliki densitas yang lebih tinggi yaitu $41,07 \pm 10,8 \%$ dan $41,9 \pm 13,4 \%$. sedangkan kelompok K1 sebesar $50,10 \pm 12,33\%$. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene test*

menunjukkan bahwa nilai P untuk kelima kelompok tersebut lebih besar dari 0,05, menunjukkan bahwa sebaran data densitas kolagen dalam kelima kelompok tersebut adalah normal dan kelompok homogen.

Tabel 5.3 Data Hasil Analisis Densitas Kolagen

VARIABEL	Kelompok					P
	K1 (%)	K2 (%)	K3 (%)	K4 (%)	K5 (%)	
Densitas Kolagen	50,10	32,75	33,07	41,07	41,9	
	12,33	6,6	7,48	10,8	13,4	
<i>Shapiro wilk</i>	0,94	0,87	0,92	0,54	0,98	
<i>Lavene test</i>						0,619
<i>One Way Anova</i>						0,088

Keterangan :

**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

**Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

**One way anova* ($p < 0,05$ = signifikan)

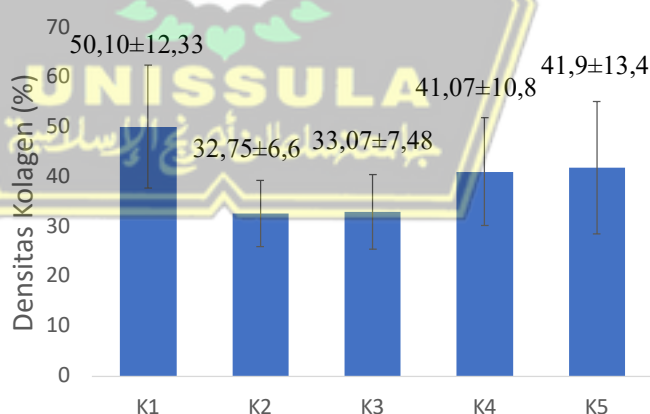
Berdasarkan data yang bersifat normal dan homogen, uji parametrik *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata densitas kolagen di antara lima kelompok. Berdasarkan hasil uji *One Way Anova* yang menghasilkan P sebesar 0,088 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan dalam densitas kolagen pada tiap kelompok. *Uji Post hoc LSD* dilakukan untuk menunjukkan perbedaan dalam densitas kolagen antar dua kelompok dan hasil ditampilkan pada Table 5.2.

Tabel 5.4 Perbedaan rerata densitas Kolagen antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5
K1	-	0,016*	0,018*	0,188	0,230
K2	0,016*	-	0,962	0,223	0,182
K3	0,018*	0,962	-	0,241	0,198
K4	0,188	0,223	0,241	-	0,903
K5	0,230	0,182	0,198	0,903	-

Keterangan: * Bermakna $p < 0,05$

Dari hasil uji *post hoc LSD* pada densitas kolagen, ditemukan bahwa nilai K1 signifikan dibandingkan dengan K2 dan K3 ($p < 0,05$), namun tidak signifikan dibandingkan dengan K4 dan K5 ($p > 0,05$). Selain itu K2 dan K3 tidak signifikan dibandingkan K4 dan K5 ($p > 0,05$). Pemberian krim EKK pada K4 dan K5 juga tidak memberikan hasil yang berbeda nyata ($p > 0,05$), lihat Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan densitas Kolagen yang signifikan

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian menunjukkan bahwa krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) dosis 10% dan 20%, efektif dalam mempengaruhi kadar PDGF, lebih tinggi dibandingkan dengan krim Vitamin E. Kemudian hasil pengukuran densitas kolagen menunjukkan bahwa kadar 10% dan 20% mampu mempengaruhi ekspresi densitas kolagen lebih tinggi dibandingkan dengan krim vitamin E.

Paparan sinar UV pada kulit dapat menyebabkan serangkaian perubahan kompleks sebagai respons terhadap paparan tersebut yang dapat menyebabkan kerusakan kulit, termasuk kerutan. Paparan ini dapat mengakibatkan kerusakan pada DNA, yang menyebabkan aktivasi sitokorn C oleh mitokondria yang berujung pada apoptosis. Apoptosis kemudian akan menyebabkan terbentuknya DAMP yang memicu inflamasi dan juga berdampak pada meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF-alpha dan IL-1b di kulit. Produksi sitokin inflamasi ini akan terus terjadi selama radikal bebas masih terjadi dalam kulit mencit yang menyebabkan tidak terproduksinya *growth factor* seperti PDGF.^{56,57}

Paparan sinar UVB pada kulit dapat menyebabkan kerusakan kulit yang signifikan, termasuk peradangan, pembentukan radikal bebas, dan degradasi kolagen yang berujung pada penuaan dini. Pemberian KEKD dapat mengurangi kerusakan dengan meningkatkan PDGF pada kulit yang terpapar UVB. PDGF adalah faktor pertumbuhan yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan, sedangkan kolagen adalah komponen struktural utama yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit.⁵⁸⁻⁶⁰

Peningkatan PDGF akibat pemberian ekstrak krim kacang kedelai pada kulit mencit yang terpapar UVB mungkin disebabkan oleh isoflavon yang terkandung dalam kacang kedelai, seperti genistein dan daidzein. Isoflavon ini memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, yang dapat mengurangi stres oksidatif dan peradangan yang diinduksi oleh UVB. Stres oksidatif yang lebih rendah memungkinkan sel-sel kulit untuk lebih efektif memproduksi PDGF, yang pada gilirannya merangsang fibroblas untuk memproduksi lebih banyak kolagen.^{61,62}

Selain itu, isoflavon dalam kacang kedelai juga dapat mempengaruhi berbagai jalur sinyal dalam sel kulit. Salah satu jalur yang mungkin terlibat adalah jalur PI3K/Akt. Isoflavon dapat mengaktifkan jalur PI3K/Akt, yang diketahui berperan dalam meningkatkan sintesis protein dan proliferasi sel. Aktivasi jalur ini dapat meningkatkan ekspresi PDGF dan produksi kolagen oleh fibroblas, sehingga memperbaiki struktur dan fungsi kulit yang rusak akibat paparan UVB.^{63,64} Jalur MAPK/ERK berperan dalam efek perlindungan KEKD pada penurunan kolagen kulit. Isoflavon dapat mengaktifkan jalur MAPK/ERK, yang penting untuk proliferasi sel dan diferensiasi fibroblas. Aktivasi jalur ini dapat meningkatkan sintesis kolagen dan mempercepat proses perbaikan kulit yang rusak. Dengan demikian, kombinasi aktivasi jalur PI3K/Akt dan MAPK/ERK oleh isoflavon dapat memberikan efek sinergis dalam meningkatkan densitas kolagen dan regenerasi kulit.⁶⁵

Secara keseluruhan, pemberian ekstrak krim ekstrak kacang kedelai (EKK) pada kulit mencit yang terpapar UVB meningkatkan PDGF dan densitas kolagen melalui aktivitas antioksidan dan modulasi jalur sinyal seluler. Namun demikian,

dalam penelitian ini tidak mengkaji protein-protein lain yang terlibat dalam proses produksi kolagen sehingga menjadi keterbatasan penelitian ini yang harus dikaji di penelitian selanjutnya.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh krim ekstrak kacang kedelai terhadap penurunan kadar Kadar PDGF dan densitas Kolagen pada mencit betina BALB/c yang dipapar UVB, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ada perbedaan kadar PDGF pada kelompok K4 dan K5 yang diberikan krim ekstrak kacang kedelai (KEKD) dosis 10% dan 20% dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Ada perbedaan jumlah densitas kolagen pada kelompok K4 dan K5 yang diberikan krim ekstrak kacang kedelai dengan dosis 10 dan 20% dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2 Saran

Penelitian ini menemukan bahwa dosis KEKD 10 dan 20% lebih efektif dalam meningkatkan PDGF dan densitas kolagen karena melebihi terapi standar, sehingga penelitian ini menyarankan penggunaan KEKD pada dosis 10 % untuk mengurangi *collagen loss*. Penelitian ini tidak menganalisis zat protein yang terlibat dalam jalur produksi sehingga tidak dapat menjelaskan secara rinci *pathway* yang dipengaruhi oleh PDGF dalam meningkatkan densitas kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

1. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Research*. 2022;71(7-8):817-831. doi:10.1007/s00011-022-01598-8
2. Leite BA, Bezerra PHA, Stocco B, et al. Biotransformed soybean cream as a new nutraceutical for skin care: collagen stimulation in vitro and ex vivo. *Braz J Med Biol Res*. 2023;56:e12781. doi:10.1590/1414-431X2023e12781
3. Ahmed IA, Mikail MA, Zamakshshari N, Abdullah ASH. Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology*. 2020;21(3):293-310. doi:10.1007/s10522-020-09865-z
4. Costa EF, Magalhães W V., Di Stasi LC. Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. *Molecules*. 2022;27(21). doi:10.3390/molecules27217518
5. Li C, Fu Y, Dai H, Wang Q, Gao R, Zhang Y. Recent progress in preventive effect of collagen peptides on photoaging skin and action mechanism. *Food Science and Human Wellness*. 2022;11(2):218-229. doi:10.1016/j.fshw.2021.11.003
6. Kong R, Cui Y, Fisher GJ, et al. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin. *Journal of cosmetic dermatology*. Published online 2016.
7. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023;9(3). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13580
8. Ntarelli N, Gahoonia N, Maloh J, Sivamani RK. Clinical Efficacy of Topical or Oral Soy Supplementation in Dermatology: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2023;12(12). doi:10.3390/jcm12124171
9. Hughes MCB, Williams GM, Pigeon H, Fourtanier A, Green AC. Dietary Antioxidant Capacity and Skin Photoaging: A 15-Year Longitudinal Study. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021;141(4):1111-1118.e2. doi:10.1016/j.jid.2020.06.026

10. Zasada M, Budzisz E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatol Alergol.* 2019;36(4):392-397. doi:10.5114/ada.2019.87443
11. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: Role of growth factors in normal and pathological wound healing: Therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(8):349-370. doi:10.1097/01.ASW.0000418541.31366.a3
12. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195(3):298-308. doi:10.1016/j.taap.2003.08.019
13. Garcella P, Wijaya TH, Kurniawan DW. Narrative Review: Herbal Nanocosmetics for Anti Aging. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research.* 2023;8(1):63. doi:10.20961/jpscr.v8i1.57675
14. Petruk G, Giudice R Del, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1454936
15. Costa EF, Magalhães W V., Di Stasi LC. Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. *Molecules.* 2022;27(21). doi:10.3390/molecules27217518
16. Roh E, Kim JE, Kwon JY, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(8):1631-1637. doi:10.1080/10408398.2014.1003365
17. Uyar B, Sivrikoz ON, Ozdemir U, Dasbasi T, Sacar H. Histological investigation of the effect of soybean (glycine max) extracts on the collagen layer and estrogen receptors in the skin of female rats. *Clinics.* 2014;69(12):854-861. doi:10.6061/clinics/2014(12)11
18. Bezerra PHA, Stocco B, Bianchi CI, et al. Soybean extract modified by *Aspergillus awamori* stimulates a greater collagen-I synthesis in the intracellular matrix of human fibroblasts. *J Cosmet Dermatol.* 2022;21(3):1243-1250. doi:10.1111/jocd.14208
19. Devi S. Pengaruh krim ekstrak kacang kedelai (Glycine max) Terhadap ekspresi MMP1 dan rasio kolagen dermis tipe I-III (Penelitian Eksperimental pada Mencit BALB/c yang dipapar sinar UVB). 2017;4(1):9-15.

20. Gromkowska-Kępa KJ, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(11):3427-3431. doi:10.1111/jocd.14033
21. Budden T, Gaudy-Marqueste C, Porter A, et al. Ultraviolet light-induced collagen degradation inhibits melanoma invasion. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-22953-z
22. Ittycheri A, Lipsky ZW, Hookway TA, German GK. Ultraviolet light induces mechanical and structural changes in full thickness human skin. *J Mech Behav Biomed Mater*. Published online 2023.
23. Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(4):225-234. doi:10.1089/wound.2014.0581
24. Ke Y, Wang XJ. TGF β Signaling in Photoaging and UV-Induced Skin Cancer. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021;141(4):1104-1110. doi:10.1016/j.jid.2020.11.007
25. Bora NS, Mazumder B, Mandal S, et al. Amelioration of UV radiation-induced photoaging by a combinational sunscreen formulation via aversion of oxidative collagen degradation and promotion of TGF- β -Smad-mediated collagen production. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;127:261-275. doi:10.1016/j.ejps.2018.11.004
26. Tarfiani IN. Uji Efektivitas Fraksi n-Heksana Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan Pembawa Vaseline terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus (Doctoral dissertation, Universitas Sumatera Utara). Published online 2023.
27. Hanafiah OA, Abidin T, Ilyas S, Nainggolan M, Syamsudin E. *Journal of International Dental and Medical Research ISSN 1309-100X Wound Healing Activity of Binahong Volume • 12 • Number • 3 • 2019 Experimental Article*. Vol 12.; 2019. <http://www.jidmr.com>
28. Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;28:53-61. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.10.002

29. Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, et al. Increased hepatic PDGF-AA signaling mediates liver insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes. *Diabetes*. 2018;67(7):1310-1321. doi:10.2337/db17-1539
30. Liu B, Zhang JN, Pu PY. Expressions of PDGF-B and collagen type III in the remodeling of experimental saccular aneurysm in rats. *Neurol Res*. 2008;30(6):632-638. doi:10.1179/174313208X291595
31. Reyhani V, Tsioumpekou M, Van Wieringen T, Rask L, Lennartsson J, Rubin K. PDGF-BB enhances collagen gel contraction through a PI3K-PLC γ -PKC-cofilin pathway. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-08411-1
32. Meier Bürgisser G, Evrova O, Calcagni M, Scalera C, Giovanoli P, Buschmann J. Impact of PDGF-BB on cellular distribution and extracellular matrix in the healing rabbit Achilles tendon three weeks post-operation. *FEBS Open Bio*. 2020;10(3):327-337. doi:10.1002/2211-5463.12736
33. Park B, Hwang E, Seo SA, Cho JG, Yang JE, Yi TH. Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1. *Arch Biochem Biophys*. 2018;637:31-39. doi:10.1016/j.abb.2017.11.007
34. Mienaltowski MJ, Birk DE. Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. In: ; 2014:5-29. doi:10.1007/978-94-007-7893-1_2
35. Chang SW, Buehler MJ. Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today*. 2014;17(2):70-76. doi:10.1016/j.mattod.2014.01.019
36. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research*. 2012;32(6):428-438. doi:10.1016/j.nutres.2012.04.005
37. Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biology*. 2020;93:79-94. doi:10.1016/j.matbio.2020.06.002
38. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1). doi:10.1186/1755-1536-5-15

39. Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(18):6098-6107. doi:10.1128/AEM.00883-15
40. Varani J, Dame MK, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology.* 2006;168(6):1861-1868. doi:10.2353/ajpath.2006.051302
41. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant.* 2018;27(5):729-738. doi:10.1177/0963689717725755
42. Specht JE, Diers BW, Nelson RL, de Toledo JFF, Torrion JA, Grassini P. Soybean. In: *Yield Gains in Major U.S. Field Crops.* Wiley Blackwell; 2015:311-355. doi:10.2135/cssaspepub33.c12
43. Brar GS, Jr TEC. *Soybean Glycine Max (L) Merrill.*; 1996.
44. Wu X, Kang J. Phytochemicals in Soy and Their Health Effects. In: *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health.* InTech; 2011. doi:10.5772/26026
45. Rizzo J, Min M, Adnan S, et al. Soy Protein Containing Isoflavones Improves Facial Signs of Photoaging and Skin Hydration in Postmenopausal Women: Results of a Prospective Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients.* 2023;15(19). doi:10.3390/nu15194113
46. Uyar B, Sivrikoz ON, Ozdemir U, Dasbasi T, Sacar H. Histological investigation of the effect of soybean (glycine max) extracts on the collagen layer and estrogen receptors in the skin of female rats. *Clinics.* 2014;69(12):854-861. doi:10.6061/clinics/2014(12)11
47. Kumar R, Deep G, Agarwal R. An Overview of Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Cancer Chemoprevention by Silibinin. *Curr Pharmacol Rep.* 2015;1(3):206-215. doi:10.1007/s40495-015-0027-9
48. Hensler S, Mueller MM. *Inflammation and Skin Cancer Old Pals Telling New Stories.*; 2013. www.journalppo.com
49. Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich spatholobus suberectus stem

extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6). doi:10.3390/nu11061341

50. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatol Venereol*. Published online 2021:37-42. doi:10.1097/JD9.0000000000000068
51. Sharma MR, Mitrani R, Werth VP. Effect of TNF α blockade on UVB-induced inflammatory cell migration and collagen loss in mice. *J Photochem Photobiol B*. 2020;213. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112072
52. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(2):65-78. doi:10.1089/wound.2014.0608
53. Xiao Z, Yang S, Chen J, et al. Trehalose against UVB-induced skin photoaging by suppressing MMP expression and enhancing procollagen I synthesis in HaCaT cells. *J Funct Foods*. 2020;74. doi:10.1016/j.jff.2020.104198
54. Kawaguchi Y. Contribution of interleukin-6 to the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 2017;2:S6-S12. doi:10.5301/jsrd.5000258
55. Nema N, Arjariya S, Bairagi SM, Jha M, Kharya MD. *In Vivo Topical Wound Healing Activity of Punica Granatum Peel Extract on Rats*; 2013. www.ajpct.org
56. Saw CL, Huang MT, Liu Y, Khor TO, Conney AH, Kong AN. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol Carcinog*. 2011;50(6):479-486. doi:10.1002/mc.20725
57. Guo S, Wang T, Zhang S, et al. Adipose-derived stem cell-conditioned medium protects fibroblasts at different senescent degrees from UVB irradiation damages. *Mol Cell Biochem*. 2020;463(1-2):67-78. doi:10.1007/s11010-019-03630-8
58. Juhl P, Bondesen S, Hawkins CL, et al. Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-74179-6

59. Madsen SF, Sand JMB, Juhl P, et al. Fibroblasts are not just fibroblasts: clear differences between dermal and pulmonary fibroblasts' response to fibrotic growth factors. *Sci Rep.* 2023;13(1). doi:10.1038/s41598-023-36416-6
60. Xu J, Clark RAF. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *Journal of Cell Biology.* 1996;132(1-2):239-249. doi:10.1083/jcb.132.1.239
61. Nirwana I, Rachmadi P, Rianti D. Potential of pomegranate fruit extract (*Punica granatum* Linn.) to increase vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor expressions on the post-tooth extraction wound of *Cavia cobaya*. *Vet World.* 2017;10(8):999-1003. doi:10.14202/vetworld.2017.999-1003
62. Luthfi M, Tantiana, Rachmawati AE, Razak FBA. Platelet Derived Growth Factor Expression after Administration of Okra Fruit Extract on Diabetic Wistar rats. *Res J Pharm Technol.* 2023;16(11):5329-5333. doi:10.52711/0974-360X.2023.00863
63. Triswara R, Farishal A, Siregar BA. Potensi Isoflavon Genistein Sebagai Terapi Suportif Imunonutrisi Pada Pasien Kanker Payudara Potential of Genistein Isoflavones As Immunonutrition Supportive Therapy in Breast Cancer Patients. *Medula.* 2020;9(4):736-741.
64. Romashkova JA, Makarov SS. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature.* 1999;401(6748):86-90. doi:10.1038/43474
65. Brady LM, Fox ES, Fimmel CJ. Polyenylphosphatidylcholine inhibits PDGF-induced proliferation in rat hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248(1):174-179. doi:10.1006/bbrc.1998.8935