

KADAR KOLAGEN KULIT DAN TULANG PADA TIKUS BETINA USIA ENAM DAN 12 BULAN YANG DISUPLEMENTASI DENGAN SOMATOTROPIN

SKIN AND BONE COLLAGEN CONCENTRATION ON SIX AND TWELVE MONTHS OF FEMALE MICE SUPPLEMENTED BY SOMATOTROPIN

NI WAYAN SUDATRI

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Udayana

Email : wsudatri@yahoo.com

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh suplementasi somatotropin terhadap kadar kolagen kulit dan tulang pada tikus betina usia enam bulan dan satu tahun. Rancangan percobaan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Faktorial dengan empat faktor yaitu dosis, lama penyuntikan, umur dan waktu pembedahan. Dosis somatotropin yang digunakan adalah 0 mg dan 9 mg/kg bobot badan. Lama penyuntikan adalah 3 minggu dan 6 minggu. Umur tikus terdiri atas enam bulan dan satu tahun, serta waktu pembedahan yaitu setelah akhir periode penyuntikan somatotropin dan 2 minggu setelah penghentian penyuntikan somatotropin. Kombinasi antarfaktor tersebut menjadi $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$. Masing-masing kelompok terdiri atas 3 ulangan sehingga jumlah tikus coba menjadi $3 \times 16 = 48$ ekor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi somatotropin dapat meningkatkan kadar kolagen kulit ($P < 0.01$) serta meningkatkan matriks sel tulang ($P < 0.05$) yang terlihat dari peningkatan kadar kolagen tulang.

Kata kunci : Kolagen, tikus betina, somatotropin

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the effects of somatotropin supplementation on skin and bone collagen concentration of six-month and one-year old female mice. Forty eight female rats were assigned into a randomized block design with 4 factors. The first factor was age with 2 levels (6 months and 12 months). The second factor was somatotropin dosage with 2 levels (0 and 9 mg/kg body weight). The third factor was duration of injection with 2 levels (3 weeks and 6 weeks), and the fourth factor was sampling period with 2 levels (0 and 14 days after somatotropin termination). The results showed that somatotropin supplementation had significant effects on bone ($P < 0.05$) and skin ($P < 0.01$) collagen concentrations.

Keywords : Collagen, female rat, somatotropin

PENDAHULUAN

Keinginan manusia untuk selalu tampil muda dan cantik sudah muncul sejak berabad-abad yang lampau. Berbagai upaya dilakukan manusia agar selalu tampak muda dan cantik dengan berusaha menghambat penuaan. Beberapa diantara upaya tersebut adalah minum jamu, ginseng, ekstrak plasenta, minum suplemen yang mengandung antioksidan, bedah kosmetik, terapi asam nukleat dan terapi hormon termasuk suplementasi somatotropin.

Tanda-tanda penuaan yang paling jelas terlihat adalah pada kulit, seperti kulit keriput, kasar dan kering serta noda-noda hitam. Keriput ataupun kerutan secara sederhana diartikan sebagai menurunnya jumlah kolagen kulit. Kolagen adalah protein bermolekul besar, merupakan komponen utama penyusun kulit. Lebih dari 71% protein dalam kulit adalah kolagen. Kolagen

berperan dalam memelihara kekencangan, elastisitas, dan regenerasi sel-sel kulit. Kolagen juga merupakan komponen utama dari tulang dan tendon. Penurunan kadar kolagen kulit menyebabkan permeabilitas sel, dan lalu lintas bahan antar sel mengalami hambatan sehingga fungsi sel menjadi terganggu dan akhirnya sel mengalami penuaan dan kematian (Bengtsoon *et al.*, 2000). Sebenarnya tubuh mempunyai kemampuan untuk memperbaiki serta mengganti sel-sel tubuh yang rusak. Namun sejalan dengan bertambahnya usia, proses perbaikan dan pergantian sel ini menjadi lambat dan penumpukan sel-sel yang mati mengganggu fungsi jaringan, organ dan fungsi fisiologis tubuh secara umum.

Penelitian ilmiah menunjukkan salah satu hal yang menandai proses penuaan adalah penurunan produksi hormon secara tidak teratur (Thompson *et al.*, 2000). Salah satu hormon yang mengalami penurunan produksi

adalah somatotropin (Petra *et al.*, 2000). Somatotropin mempengaruhi hampir semua sel di dalam tubuh. Dengan bertambahnya usia, kadar somatotropin dalam tubuh terus menurun. Sejak usia 21 tahun, setiap tahun tubuh mengalami penurunan sekitar 3% sehingga pada usia 60 tahun tubuh kita akan kehilangan sekitar 80% somatotropin alamiah (Rosen *et al.*, 1995).

Somatotropin atau GH (*Growth hormone*) dihasilkan oleh pituitari anterior. Somatotropin menyebabkan pertumbuhan semua jaringan tubuh yang mampu tumbuh. Somatotropin meningkatkan pertumbuhan ukuran sel dan meningkatkan mitosis bersama peningkatan jumlah sel. Somatotropin mempengaruhi berbagai jaringan target secara langsung maupun tidak langsung. Pengaruh tidak langsung somatotropin dalam mempengaruhi pertumbuhan adalah merangsang faktor pertumbuhan. Sebagai contoh, kemampuan somatotropin dalam merangsang pertumbuhan tulang sejati dan tulang rawan sebagian disebabkan oleh pemberian sinyal dari hormon tersebut ke hati untuk menghasilkan faktor pertumbuhan yang mirip insulin (*insulin-like growth factor*, IGF-1) (Guyton, 1995).

Somatotropin melalui IGF-1 mengaktifasi anabolisme protein pada kulit seperti kolagen dan elastin. Pada hewan coba yang diperlakukan dengan somatotropin terlihat sintesis kolagen meningkat, kulit menjadi lebih tebal karena anabolisme protein meningkat, efek perbaikan jaringan kulit meningkat serta kelembaban serta turgor kulit juga meningkat (Klatz, 1998). Berdasarkan informasi di atas, maka penelitian pengaruh kadar suplementasi somatotropin pada dosis, waktu pemberian dan umur tikus yang berbeda untuk mengetahui tingkat kadar kolagen kulit pada tikus betina coba penting untuk dilakukan.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di kandang percobaan FKH IPB, Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi FKH IPB mulai November 2005 sampai dengan Maret 2006. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 48 ekor tikus betina strain Wistar yang terdiri atas kelompok umur enam bulan (24 ekor) dan satu tahun (24 ekor).

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Faktorial dengan 4 faktor yaitu dosis, lama penyuntikan, umur dan waktu pembedahan. Dosis somatotropin yang digunakan adalah 0 mg dan 9 mg/kg berat badan. Lama penyuntikan adalah 3 minggu dan 6 minggu. Umur tikus percobaan terdiri atas enam bulan dan satu tahun serta waktu pengambilan sampel yaitu satu hari dan 2 minggu setelah penyuntikan dihentikan. Kombinasi antarfaktor tersebut menjadi $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$. Masing-masing kelompok terdiri atas 3 ulangan sehingga jumlah tikus coba menjadi : $3 \times 16 = 48$ ekor. Pada kelompok yang disuntik dengan somatotropin selama 3 minggu

setelah sinkronisasi disampling sebagian dan dibiarkan sebagian untuk disampling 2 minggu kemudian. Begitu juga dengan kelompok yang disuntik selama 6 minggu, setelah disinkronisasi disampling sebagian, setengahnya lagi disampling 2 minggu kemudian. Pada setiap pembedahan jumlah tikus yang dibedah adalah 12 ekor.

Sebelum diberi perlakuan, semua hewan coba diaklimatisasikan terlebih dahulu di dalam kandang percobaan selama satu minggu. Selama pemeliharaan hewan coba diberi makan pelet standar dan minum air keran secara *ad libitum*. Sebelum diberi perlakuan semua tikus betina ditimbang bobot awalnya. Penyuntikan somatotropin dilakukan secara intramuskuler (im) sesuai dengan rancangan percobaan. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus terlebih dahulu dibius dengan eter. Organ-organ yang akan dianalisis dipisahkan dan dibersihkan serta ditimbang bobot basahnya. Organ-organ yang akan dianalisis dimasukkan ke dalam alkohol 70% dan eter secara bergantian selama 2 jam, kemudian dikeringkan dalam oven (suhu 60°C) sampai diperoleh bobot kering bebas lemak (BKBL). Selanjutnya dilakukan proses penggerusan sampai halus untuk penyiapan analisis kadar kolagen kulit dan tulang. Kadar air dihitung dengan mengurangkan bobot basah organ dengan bobot kering organ.

Prosedur Penentuan Kadar Kolagen Kulit Dan Tulang

Penentuan kadar kolagen dilakukan sesuai dengan yang dilakukan oleh Manalu dan Sumaryadi (1998). Ekstraksi sampel dilakukan dengan menimbang 25 mg bahan kering bebas lemak (BKBL) dari tulang dan kulit dan langsung dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 5 ml HCl 6 N pada setiap sampel dan ditutup dengan aluminium foil, kemudian tabung reaksi diletakkan pada penangas air bersuhu 130°C selama 3 jam atau dalam air mendidih kurang lebih 5 jam sampai larutan homogen kuning muda. Jika terjadi penguapan selama pemanasan ditambahkan lagi HCl 6 N sebanyak 5 ml. Isi tabung dituang dan dibaca pada pH 6 – 7 (seragam) dengan menambahkan NaOH 2 N jika keasaman atau HCl 6 N jika kebasaaan. Volume akhir sampel dicatat.

Langkah selanjutnya adalah pewarnaan dan pengujian kadar kolagen. Tabung reaksi dipersiapkan kemudian dilabel untuk blank, standar dan sampel. Masing-masing tabung diisi reagen sebagai berikut, sehingga akan berwarna kuning :

Tabung	Diisi
Blank	2 ml H ₂ O
Standar a	2 ml st 400
Standar b	2 ml st 200
Standar h	2 ml st 0
Sampel 1	2 ml s-1
Sampel 2	2 ml s-2
Sampel 50	2 ml s-50

Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml Cloramin-T dan dikocok (divorteks), dibiarkan pada suhu kamar selama 20 menit. Selanjutnya pada setiap tabung ditambahkan 1 ml PCA kemudian dikocok (divorteks) dan dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya pada setiap tabung reaksi ditambahkan 1 ml p-dimetilaminobenzaldehyde dan dikocok (divorteks). Kemudian tabung diletakkan pada penangas air bersuhu 60°C selama 20 menit. Setelah itu, didinginkan pada keran air mengalir (tabung direndam dalam wadah berisi air dingin) selama 5 menit. Terakhir dibaca dengan spektrofotometer U-2001 Merk Hitachi τ 577 μm (dilakukan dalam waktu 1 jam). Alat sebelumnya dipanaskan 15 menit dan setiap 25 sampel distandarisasi lagi untuk blanko.

Faktor pengenceran sampel adalah 25 mg BKBL / Vol akhir (pH 6-7) = Z BKBL/ml. Sampel yang dibaca sebanyak 2 ml = 2 x Z = 3Z mg BKBL. Misal hasil baca spektrofotometer = Y μg. Jadi konsentrasi kolagen sampel = Y/3Z μg/mg BKBL.

HASIL

Kadar air kulit dipengaruhi oleh umur, dosis somatotropin yang diberikan serta waktu pengambilan sampel terlihat pada Tabel 1. Tikus yang berumur 6 bulan mempunyai kadar air kulit lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang berumur 12 bulan. Pemberian somatotropin dosis 9 mg/kg BB meningkatkan kadar air kulit, tetapi setelah penyuntikan dihentikan kadar air kulit justru menurun (kembali seperti kontrol).

Kekencangan kulit yang digambarkan oleh kadar kolagen kulit menunjukkan bahwa kolagen kulit secara sangat signifikan dipengaruhi oleh dosis somatotropin (P<0.01) dan lama penyuntikan (P<0.01) serta waktu pengambilan sampel (P<0.01). Sementara itu, umur juga berpengaruh cukup signifikan (P<0.01) pada kadar kolagen kulit. Artinya, tikus yang berumur 6 bulan mempunyai kadar kolagen kulit lebih rendah dibandingkan dengan tikus umur 12 bulan dalam penelitian ini. Pemberian dosis somatotropin sebanyak 9 mg/kg BB sangat signifikan meningkatkan kadar kolagen kulit. Lama penyuntikan 3 minggu dan 6 minggu juga sangat signifikan meningkatkan kadar kolagen kulit dan setelah penyuntikan somatotropin dihentikan kadar kolagen kulit tetap tinggi. Peningkatan kadar kolagen kulit pada tikus yang berumur 6 bulan dan 12 bulan masing-masing sebesar 14% dan 11% jika dibandingkan dengan kontrol. Kadar kolagen kulit tikus umur 6 bulan dan satu tahun lebih rendah masing-masing sebesar 13.5% dan 19.7%, bila dibandingkan dengan kadar kolagen kulit tikus muda umur 2 bulan.

Kadar air tulang dipengaruhi oleh umur, dosis somatotropin, dan lama penyuntikan somatotropin. Tikus umur 6 bulan mempunyai kadar air tulang lebih tinggi dari tikus umur 12 bulan. Penyuntikan somatotropin meningkatkan kadar air tulang. Lama penyuntikan meningkatkan kadar air tulang (Tabel 2).

Tabel 1. Rataan kadar air dan kolagen kulit

Umur	LP	WS	Kadar air (%)		Kolagen (μg/mgBK)	
			Dosis		Dosis	
			0	9	0	9
6	1	1	66.7±0.77 ^b	68.5±0.75 ^c	57.68±2.71 ^a	64.76±2.18 ^{ab}
	3	2	67.4±0.4 ^{bc}	64.2±0.5 ^{ab}	72.23±0.57 ^{ab}	87.91±1.73 ^{ab}
	TR		67.5	66.35	65.01	75.88
6	1	1	66.9±0.2 ^{bc}	66.4±0.7 ^b	68.65±0.21 ^{ab}	74.71±2.21 ^{ab}
	6	2	65.9±0.8 ^{bc}	67.1±0.6 ^b	72.37±0.87 ^{ab}	84.79±2.78 ^b
	TR		66.40	66.75	70.51	77.75
12	1	1	62.4±1.41 ^a	66.9±0.8 ^b	64.40±6.72 ^{ab}	67.86±9.59 ^b
	3	2	61.7±0.8 ^a	61.8±0.4 ^a	74.23±9.08 ^{ab}	85.35±2.47 ^b
	TR		62.50	64.35	69.32	77.63
12	1	1	64.1±0.1 ^{ab}	61.8±0.07 ^a	66.66±8.69 ^{ab}	85.43±4.26 ^b
	6	2	64.2±1.7 ^{ab}	64.4±2.44 ^{ab}	84.15±2.65 ^b	81.05±4.66 ^b
	TR		64.2	63.1	75.49	83.24
TR			63.35	63.72	72.41	80.43

Keterangan : LP = Lama Penyuntikan (3 minggu dan 6 minggu), WS = Waktu Sampling (1 dan2), TR = Total Rataan. Huruf yang sama pada baris dan kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0.05).

Tabel 2. Rataan kadar air dan kolagen tulang

Umur	LP	WS	Kadar air (%)		Kolagen (μg/mgBK)	
			Dosis		Dosis	
			0	9	0	9
6	1	1	31.9±2.05 ^{ab}	32.66±1.47 ^{ab}	32.01±1.22 ^{abc}	30.90±1.31 ^{ab}
	3	2	30.7±2.13 ^{ab}	30.28±0.65 ^{ab}	27.38±1.76 ^{ab}	30.86±2.00 ^{ab}
	TR		31.3	31.37	29.69	30.88
6	1	1	34.3±1.54 ^{ab}	33.31±0.85 ^{ab}	28.34±0.36 ^{ab}	31.06±2.96 ^{ab}
	6	2	34.8±2.22 ^b	37.4±10.65 ^{ab}	31.51±4.42 ^{abc}	52.10±4.99 ^e
	TR		34.5	35.35	29.92	31.0
12	1	1	29.1±1.19 ^a	31.92±3.94 ^a	29.60±2.43 ^{abc}	35.79±4.95 ^b
	3	2	31.06±2.90 ^{ab}	28.07±1.48 ^a	26.78±1.50 ^{ab}	27.25±1.34 ^{ab}
	TR		30.03	30.01	28.19	31.52
12	1	1	27.49±0.34 ^a	29.55±1.24 ^a	25.79±1.51 ^{ab}	29.16±3.37 ^{ab}
	6	2	35.94±2.62 ^b	37.15±1.78 ^b	42.44±4.06 ^{de}	40.52±2.22 ^{cd}
	TR		31.71	33.35	33.61	34.88
TR			30.82	31.67	30.90	33.20

Keterangan : LP = Lama Penyuntikan (3 minggu dan 6 minggu), WS = Waktu Sampling (1 dan2), TR = Total Rataan. Huruf yang sama pada baris dan kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0.05).

Penyuntikan somatotropin meningkatkan massa matriks tulang yang digambarkan oleh kadar kolagen tulang. Terjadi interaksi dosis somatotropin dan lama penyuntikan serta dosis dan waktu sampling dalam mempengaruhi kadar kolagen tulang. Kedua interaksi ini terlihat sangat signifikan yaitu P<0.01. Tikus umur 6 bulan dan 12 bulan mengalami peningkatan kadar kolagen tulang masing-masing sebesar 3.7% dan 7% jika dibandingkan dengan kontrol. Kadar kolagen tulang tikus umur 6 bulan dan 12 bulan lebih rendah masing-masing 26.43% dan 23.74% dibandingkan dengan kadar kolagen tulang tikus muda umur dua bulan.

PEMBAHASAN

Somatotropin berpengaruh sangat signifikan pada peningkatan kadar kolagen kulit dan kadar kolagen tulang. Peningkatan kadar kolagen berfungsi menjaga elastisitas/ kekencangan kulit serta kadar air kulit lebih

tinggi pada kelompok yang disuntik somatotropin dibandingkan dengan kontrol.

Pada tulang, matriks ekstraselulernya kebanyakan adalah kolagen. Jadi tingginya kadar kolagen pada tulang merefleksikan banyaknya massa matriks pada tulang. Rita *et al.* (2000) mengatakan bahwa aktivitas fosfatase, osteokalsin dan enzim prokolagen I karboksil peptida di serum meningkat dalam kisaran yang normal akibat meningkatnya kadar IGF-1 pada pasien yang diterapi dengan GH. Inzucchi dan Robbins (1994) juga sependapat bahwa pemberian GH meningkatkan massa tulang karena GH yang bekerja melalui IGF-1 merangsang pembentukan osteoblast. IGF-I/GH dalam memacu pertumbuhan tulang kemungkinan melalui pengaktifan 1-alfa hidroksilase di ginjal sehingga meningkatkan produksi vitamin D3 dan laju filtrasi glomerulus (Tarcisio *et al.*, 1998).

SIMPULAN

Dari hasil analisis dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa suplementasi somatotropin pada tikus betina usia enam bulan dan 12 bulan meningkatkan kadar kolagen tulangnya masing-masing sebesar 3.7% dan 7%. Kadar kolagen kulit pada tikus yang berumur 6 bulan dan 12 bulan juga meningkat dengan pemberian somatotropin yaitu masing-masing sebesar 14% dan 11%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Wasmen Manalu dan Ibu Dr. Nastiti Kusumorini yang telah banyak memberikan masukan selama pelaksanaan penelitian.

KEPUSTAKAAN

- Bengtsson, B.A, J. Gudmundur, M.S. Stephen, S. Helen, H.S. Peter. 2000. Treatment of Growth Hormone Deficiency in Adults . J. Clin. Endocrinol. Metabol. 85: 933-942.
- Guyton, A.C. 1995. Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit. Edisi III. Petrus A, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Text Book of Medical Physiology.
- Inzucchi, S.E, R.J. Robbins. 1994. Effects of Growth Hormone on Human Bone Biology. Clinical Review 61. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 79: 691-694.
- Klatz, R., C. Kahn. 1998. Grow Young with hGH. New York, USA: Harper Perennial.
- Manalu, W., M.Y. Sumaryadi. 1998. Maternal Serum Progesterone Concentration During Gestation and Mammary Gland Growth and Development at Parturition in Javanese Thin-Tail Ewes with Carrying a Single or Multiple Fetuses. Small. Rum. Res. 27:131-136.
- Petra, T.E., A.F. Morales, J. Odeberg, J. Lunderberg, G. Norstedt. 2000. Differential Cloning of Growth Hormone Regulated Hepatic Transcripts in Aged Rat. J Endocrinol. Metabol. 14: 308-318.
- Rita, F., M. Brammert, H.A. Erik, A. Hilding, D.J. Daylink, S. Mohan. 2000. Growth Hormone Replacement Therapy Improves Body Composition and Increases Bone Metabolism in Elderly Patients with Pituitary Disease. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 85: 4104-4112.
- Rosen, T., G. Johansson, B.A. Bengtsson. 1995. Consequences of Growth Hormone Deficiency in Adults and The Benefits and Risks of Recombinant Human Growth Hormone Treatment. Hormone Research 43: 93-99.
- Tarcisio, B., Y. Glatz, R Bouillon, E.R. Froesch, C. Schmid. 1998. Effects of Short-term Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) or Growth Hormone (GH) Treatment on Bone Metabolism and on Production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient Adult. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 83: 81-87.
- Thompson, M.M., T.T. Oyama, F.J. Kelly, T.M. Kennefick, S. Anderson. 2000. Activity and Responsiveness of Renin-angiotensin System in The Aging Rats. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Physiol. 279: 1787-1794.