

Efek Jus Buah Tomat (*Lycopersicum pyriforme*) terhadap Pencegahan Fotoaging Kulit Akibat Iradiasi Sinar Ultraviolet-B

(The Effect of Tomato (*Lycopersicum Pyriforme*) Juice on the Prevention of Photoaging of the Skin as a Result from Ultraviolet-b Irradiation)

Poncojari Wahyono*, Soetjipto**, Harjanto**, Suhariningsih***

ABSTRACT

Photoaging is caused by a lack of collagen and skin elastine fibres due to external factors such as solar UV which may give negative effects on skin, for examples, wrinkled, pigmentation spotted, low elasticity and hard textures. The process of such an early aging may be blocked or prevented by avoiding factors that may accelerate it. However, so far no explanation has suggested that the effect of tomato juice with a dosage of 11 g/kg Body Weigh may give effects on ROS activity, AP-1 expression, and type-1 collagen expression in rat's skin radiated with UV-B with a dosage of 150 mJ/cm². The objective of this study was to analyze the effect of tomato juice on the prevention of collagen damage due to the irradiation of UV-B light. The method of this research was used 24 has divided into 4 groups consisting of 6 rat each. The control group were not irradiated with UV-B or were not given tomato juice (P₀). The experimental group were given the following treatments: exposure to UV-B light of 150 mJ/cm² (P₁), exposure to UV-B light of 150 mJ/cm² + giving of tomato juice with the dosage of 11 g/Kg/Body Weight (P₂) exposure UV-B irradiation with the dosage of 150 mJ/cm² + combination application of lycopene, β-carotene, and vitamin C of which their content is equal with that of tomato 11 g/kg body weight (P₃). Treatments were given to each group for 6 weeks. An experimental design using a cluster random with 4 treatments and 6 replication was employed. AP-1 and type-1 collagen expression, were measured with immunohistochemistry, and the MDA content with NWLSS MDA Assay technique. The data were analysed using a variance analysis and then followed with LSD Test. It can be concluded that the application of tomato juice 11 g/kg body weight or of a combination of lycopene, β-carotene, and vitamin C of which its content equals to 11 g/kg body weight may prevent to increase the content of MDA (as indicator of ROS), AP-1 expression, but may prevent to decrease the expression of type-1 collagen in the rat skin radiated with UV-B 150 mJ/cm². However, it also found that the application of a combination of lycopene, β-carotene, and vitamin C of which its content equals to 11 g/kg body weight may give no significant difference compared with the application of tomato juice 11 g/kg body weight.

Key words: Photoaging, UV-B, MMP-1, collagen Tipe-1, and collagen

PENDAHULUAN

Salah satu perubahan proses penuaan yang dapat dilihat di kulit. Meningkatnya usia, sebagaimana pada organ yang lain, fungsi kulitpun ikut menurun, sel kulit yang mati melekat lebih lama dilapisan terluar kulit, sehingga kulit mengering, kusam dan terasa kasar. Produksi kolagen juga mengalami penurunan sebagai akibat bertambahnya usia, sinar matahari ataupun penyakit yang lain. Kolagen ini seharusnya menjadi penunjang kulit agar terlihat kencang. Sebagai akibatnya kulitpun akan kehilangan elastisitas, sehingga mulai terlihat kendur dan berkeriput.

Berdasar klinis, proses menua terbagi atas Penuaan kulit pada dasarnya terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu penuaan *intrinsik/kronologi (chronological aging)*: merupakan proses menua fisiologis, perubahan sesuai dengan umur kronologis; dan proses menua ekstrinsik (*photoaging*): yang disebabkan oleh faktor eksternal seperti sinar matahari, polusi udara, alat elektronik dan nutrisi yang tidak seimbang. Penuaan kronologi ditunjukkan dari adanya perubahan struktur, dan fungsi serta metabolisme kulit seiring berlanjutnya usia. Proses ini termasuk kulit menjadi kering dan tipis; munculnya kerutan halus, adanya pigmentasi

* Universitas Muhammadiyah Malang

** Fakultas Universitas Ailangga

*** Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

kulit (age spot). Sedangkan fotoaging ditunjukkan dengan berkurangnya kolagen serta serat elastin kulit akibat faktor luar seperti radiasi sinar UV matahari, yang memiliki efek negatif menimbulkan seperti keriput, bercak pigmentasi, penurunan elastisitas kulit dan tekstur menjadi kasar (Yaar *et al.*, 2002; Yaar & Gilchrist, 2003). Proses penuaan dini dapat dihambat atau dicegah dengan menghindari faktor yang mempercepat proses itu (Fisher *et al.*, 1997).

Radiasi sinar UV matahari pada sel hidup dapat menyebabkan berbagai resiko foto kimiawi seperti, foto isomerisasi, dan foto oksidasi. Reaksi foto oksidasi terjadi akibat pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) berupa : anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($OH^{\bullet}$) oleh kromofor yang menyerap sinar ultraviolet (Kochavar, 1995; Jung & Bohnert *et al.*, 1995). Reaksi kulit terhadap radiasi sinar UV, di antaranya adalah: terbentuknya radikal bebas ($O_2^{\bullet-}$ dan $OH^{\bullet}$), dan kematian sel secara langsung. Pengaruh patobiologi sinar ultraviolet (UV-A dan UV-B) menghasilkan radikal bebas dan menimbulkan kerusakan pada DNA, disinyalir radikal bebas inilah merupakan faktor utama yang mempercepat proses penuaan dini (Beckman *et al.*, 1998).

Meningkatnya ROS sebagai akibat radikal bebas karena sinar UV-B ini dapat menyebabkan naiknya peroksidasi lipid. Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim anti oksidan dan tingginya malondialdehid (MDA) (Zakaria dkk., 2000). Senyawa ROS ini juga berperan dalam metabolisme kolagen, sebab dapat menghancurkan kolagen dan menginduksi beberapa enzim yang berperan dalam degradasi kolagen yaitu matriks metaloproteinase (MMPs), sehingga mengakibatkan kolagen kulit mengalami penurunan (Dalle & Pathak, 1992; Pinnell, 2003). Hal ini terjadi karena meningkatnya ROS dapat meningkatkan AP-1, radiasi terhadap kulit pantat manusia menggunakan 2 MED (dua kali dosis UV-B yang menyebabkan kemerahan pada kulit), ternyata hal ini juga menyebabkan peningkatan pembentukan hidrogen peroksida dan ROS dalam waktu 15 menit. Dalam waktu yang sama ternyata AP-1 juga mengalami peningkatan setidaknya sampai 24 jam setelah radiasi UV-B (Fisher *et al.*, 1996). Sedangkan AP-1 mendorong terjadinya pemecahan kolagen dengan cara mengatur peningkatan kembali enzim yang disebut matriks metaloproteinase (MMPs) (Helfrich *et al.*, 2008).

MMP-1 akan memecah kolagen tipe-1. Rusaknya kolagen tipe I ini akan mengakibatkan terjadinya penurunan produk kolagen. Terakumulasinya penurunan kolagen ini

merupakan indikator pada kulit yang mengalami kekeriputan akibat proses penuaan (Pinnell, 2003).

Radiasi UV-B sebanyak 3 kali seminggu selama 6 minggu dengan ukuran 130 mJ/cm^2 secara *in vivo* menyebabkan peningkatan kerusakan fibroblast pada tikus Vayalil *et al.*, (2004) melaporkan bahwa radiasi UV-B dengan dosis 90 mJ/cm^2 selama 2 bulan dengan pemberian 2 hari sekali dapat meningkatkan aktivitas MMP-3 pada kulit tikus secara *in vivo*. Radiasi UV-B setiap hari selama sebulan dengan dosis 90 mJ/cm^2 , 130 mJ/cm^2 150 mJ/cm^2 kulit punggung tikus *in vivo* menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi AP-1, MMP1 dan penurunan kolagen tipe 1, dan semakin tinggi dosis UVB semakin meningkat ekspresi AP-1 dan MMP1 dan semakin menurun kolagen tipe-1 (Wahyono, 2008)

Buah tomat (*Lycopersicon periforme*) mengandung berbagai komponen penting, yaitu antara lain vitamin C, β -karoten dan likopen yang mempunyai efek antioksidan. Dari studi yang dilakukan diketahui bahwa likopen bisa berfungsi sebagai antioksidan yang kuat. Likopen bisa bereaksi dengan radikal bebas agar berhenti merusak sel. Laporan penelitian menunjukkan bahwa β -karoten sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya penyakit jantung dan kanker (Giovannucci, 1999; Sesso *et al.*, 2003). Hasil Penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus buah tomat dengan dosis 7,11 dan 15 g/kg BB ternyata mampu menurunkan kadar SGOT, SGPT dan MDA hepar tikus coba yang diinduksi dengan CCl_4 (Wahyono, 2006). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus buah tomat dengan 11 g/kg BB paling efektif dalam mencegah kenaikan ekspresi MMP-1, MMP-3 dan mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1 pada kulit punggung tikus yang dibiarkan mengalami penuaan dari 4 hingga 18 bulan (Wahyono, 2008,2009).

Data di atas merupakan fakta yang terungkap dari manfaat buah tomat dalam mencegah kerusakan sel tubuh akibat radikal bebas, namun demikian belum diungkap lebih jauh tentang kemampuan jus buah tomat dalam mencegah efek radikal bebas pada kulit akibat pemberian sinar UV-B. Adanya ROS pada kulit akibat radiasi sinarnya UV-B meningkatkan ekspresi AP-1, meningkatnya AP-1 akan meningkatkan MMP-1, yang kemudian MMP-1 akan memecah kolagen tipe-1. Rusaknya kolagen tipe-1 akan menurunkan produksi kolagen sehingga menimbulkan keriput pada kulit (Pinnell, 2003), disamping itu tingginya ROS juga menyebabkan naiknya kadar MDA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek jus tomat dosis 11 g/kg BB dan efek pemberian berbagai bahan antioksidan

dalam buah tomat (likopen, β -karoten dan vitamin C) yang kandungannya setara dengan yang di dalam jus buah tomat dosis 11 g/kg BB dalam mempengaruhi aktivitas ROS, kadar MDA ,ekspresi AP-1 dan ekspresi kolagen tipe-1 pada kulit tikus yang diradiasi UV-B dengan dosis 150 mJ/cm².

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) dengan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*).

Materi penelitian adalah buah tomat (*Lycopersicum pyriforme*) yang ditanam dengan menggunakan pupuk organik yang diperoleh dari Laboraturium Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang. Digunakan buahnya yang sudah matang di pohon, setelah dicuci bersih, di ekstrak diambil sari buahnya saja.

Pembuatan ekstrak buah tomat dan pemeliharaan tikus coba dilakukan di laboraturium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang. Pembuatan ekstrak buah tomat dilakukan di laboraturium Biokimia Universitas Muhammadiyah Malang. Pembuatan Preparat dilakukan di Laboraturium Patologi Anatomi RSUD. Dr. Soetomo/ FK Universitas Airlangga Surabaya. Pengecatan dan pengamatan imunohistokimia MMP-1, MMP3 dan Kolagen Tipe-1 dilakukan Lab. Biokimia-Biomolekuler FK Universitas Brawijaya.

Perlakuan pada Tikus Putih

Dua puluh lima ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan umur 3,5 bulan dengan berat rata-rata 220 gram, diaklimatisasi terhadap lingkungan kandang di laboraturium selama 2 minggu. Secara acak tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, dengan masing-masing kelompok sebanyak 6 tikus. Kelompok P0 sebagai kontrol negatif (tikus tidak diberi sinar UVB), kelompok P1 (tikus diberi sinar UVB). Kelompok P2 adalah tikus yang mendapatkan pemberian ekstrak buah tomat melalui oral tiap dua hari sekali dengan dosis 11 g/kg BB dan diberi iradiasi UVB, kelompok P3 adalah kelompok tikus yang diberi kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada di dalam buah tomat 11 g/kg/BB dan diberi iradiasi UVB.. Tikus dimatikan bersama setelah mendapatkan pembiusan sebelumnya dengan eter pada hari ke 43 pada pagi hari untuk pengambilan jaringan.

Tabel 1. Pemberian perlakuan per oral

Kelompok	Perlakuan	sasaran	waktu	dosis
P0	kontrol negatif	6 tikus	dibiarkan selama 6 minggu	-
P1	kontrol positif (pemberian UVB)	6 tikus	tiap 2 hari sekali selama 6 minggu	-
P2	ekstrak buah Tomat + UVB	6 tikus	setiap 2 hari sekali selama 6 minggu	7 mg/kg BB
P3	likopen, β -karoten Vitamin C + UVB	6 tikus	setiap 2 hari sekali selama 6 minggu	setara dengan buah 11 mg/kg BB

Pemeriksaan test NWLSS untuk menentukan kadar MDA

Dengan menggunakan Kadar MDA (μ mol/mL) untuk indikator pemeriksaan. Kadar senyawa yang terbentuk akibat peristiwa oksidasi yang terjadi pada lipid yang mengandung asam lemak dengan banyak ikatan rangkap di membran plasma sel pada kulit bagian punggung tikus pada saat setelah pemberian perlakuan, yang diperiksa dengan menggunakan Test “The NWLSS™ Malondialdehyde Assay (NWK-MDA01)”.

Pengamatan Immunohistokimia terhadap AP-1, dan Kolagen tipe-1

Gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 5 0% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH₂O selama 5 menit.

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Blocking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Bloking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Inkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti (AP-1 dan kolagen tipe-1) selama 60 menit.Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Inkubasi menggunakan *anti rabbit HRP conjugated* selam 40 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Cuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit.

Counterstaining menggunakan Mayer Hematoksilin yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan *tap water*. Bilas menggunakan dH_2O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass. Pengamatn dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran $400\times$ (Pizem & Andrej, 2003).

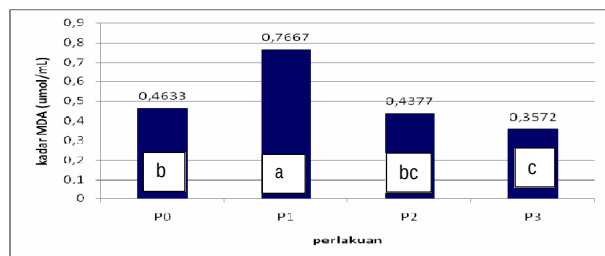
Analisis statistik menggunakan uji statistik One Way Anova pada tingkat kepercayaan $\alpha = 0,01$, dilanjutkan dengan uji statistik LSD (*Least Significance Difference*). Untuk menguji perbedaan antara berbagai perlakuan terhadap kadar MDA, ekspresi AP-1 dan ekspresi Kolagen tipe1 kulit punggung tikus hewan coba.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil Test “The NWLSS™ Malondialdehyde Assay (NWK-MDA01)” terhadap Kadar MDA sebagai Indikator Aktivitas ROS

Teknik NWK-MDA01 merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memeriksa kadar MDA pada jaringan kulit. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar MDA sebagai indikator adanya aktivitas ROS pada jaringan kulit punggung tikus Wistar pada semua kelompok perlakuan.

Hasil Anova menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,01$). Uji LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna,



Gambar 1. Grafik kadar MDA pada pemberian berbagai perlakuan terhadap jaringan kulit tikus.

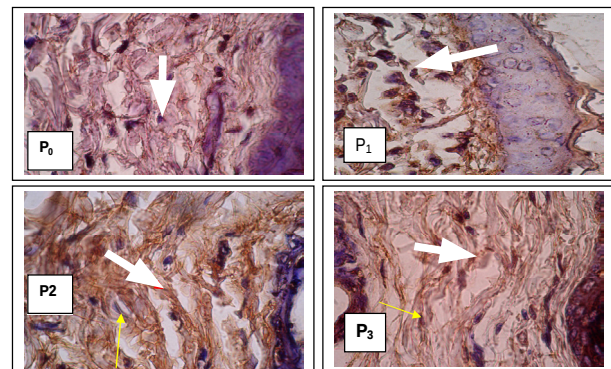
Keterangan: P0 = kadar MDA pada sel kulit kelompok Kontrol (tanpa radiasi UV-B dan tanpa pemberian antioksidan); P1 = kadar MDA pada sel kulit kelompok Kontrol (pemberian radiasi UV-B tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu P2= kadar MDA pada pemberian ekstrak buah tomat 11 g/kg/BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu; dan P3= kadar MDA pada pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu. Huruf pada grafik yang diikuti huruf sama menunjukkan bahwa antar perlakuan tersebut tidak ada perbedaan yang signifikan.

ada perbedaan secara signifikan antara P0 dengan P1, P2, dan P3, tetapi antara P1 dengan P2 dan antara P2 dengan P3 tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa sel kulit menurun jumlah MDA nya pada pemberian jus buah tomat maupun pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB)(gambar 1).

Gambar 1 tersebut di atas diketahui bahwa Kelompok kontrol (P1) didapatkan MDA paling banyak ($0,7667 \pm 0,0468 \mu\text{mol/mL}$), dan paling sedikit ditemukan pada kelompok (P3) yakni sebanyak ($0,3572 \pm 0,0277 \mu\text{mol/mL}$), namun demikian antara P2 dan P3 tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas ROS pada jaringan kulit menurun pada pemberian jus buah tomat maupun pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C) yang kandungannya setara dengan yang di dalam jus buah tomat 11 mg/kg BB).

Hasil Test Imunohistokimia pada ekspresi AP-1

Teknik imunohistokimia merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memeriksa ekspresi AP-1 pada jaringan kulit. Identifikasi AP-1 pada penelitian



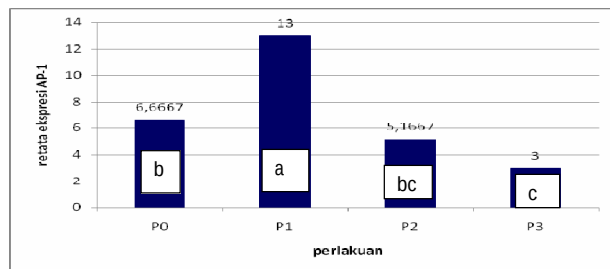
Gambar 2. Ekspresi AP-1 pada jaringan kulit tikus pada berbagai perlakuan dengan teknik imunohistokimia (pembesaran $400\times$).

Keterangan: Warna coklat menunjukkan ekspresi AP-1 (ditunjuk panah besar), warna tidak coklat (transparan) menunjukkan tidak adanya ekspresi AP-1 (ditunjuk panah kuning). P0 = Ekspresi AP-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (tanpa radiasi UV-B dan tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P1= Ekspresi AP-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (pemberian radiasi UV-B tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P2= Ekspresi AP-1 pada pemberian ekstrak buah tomat 11 g/kg/BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu, dan P3= Ekspresi AP-1 pada pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu.

ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan AP-1 pada jaringan kulit punggung tikus Wistar pada semua kelompok perlakuan. Gambaran sel (*gambar 2*) menunjukkan bahwa sel yang tidak mengekspresikan AP-1 akan tidak berwarna sedangkan yang mengekspresikan AP-1 berwarna coklat, yang selanjutnya dihitung pada 20 lapangan pandang, dan dibuat reratanya.

Gambar 2 tersebut di atas diketahui bahwa Kelompok kontrol (P1) ditemukan sel tikus berwarna coklat dengan jumlah paling banyak, dan paling sedikit ditemukan pada kelompok pemberian ekstrak buah tomat 11 g/kg BB (P3). Kelompok P1 ditemukan sel berwarna coklat dengan jumlah paling banyak dibandingkan P0, P2, dan P3. Sedangkan antara Kelompok P0, P2, dan P3 sel yang mengekspresikan AP-1 tidak banyak perbedaan Kelompok dengan jumlah sel epidermis berwarna coklat (mengekspresikan AP-1) paling sedikit pada kelompok P3, walaupun tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P2. Ekspresi AP-1 pada sel epidermis kulit terlihat pada membran dan inti sel, dimana pada kelompok P1 (*gambar 2*) terlihat warna coklat yang lebih tebal dibandingkan kelompok lain baik pada membran maupun inti sel.

Hasil Anova menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,01$). Uji LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna antara P1 dengan P0, P2, dan P3, sedangkan antara P0, dan



Gambar 3. Grafik ekspresi AP-1 pada jaringan kulit tikus pada pemberian berbagai perlakuan.

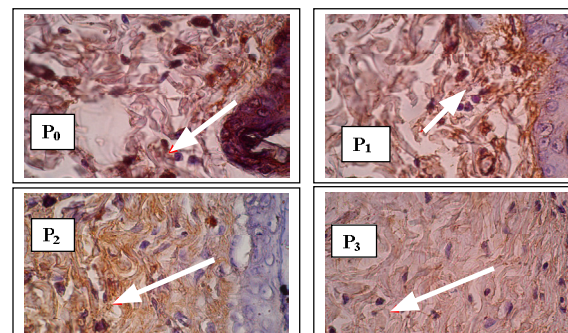
Keterangan: P0 = ekspresi AP-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (tanpa radiasi UV-B dan tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P1 = ekspresi AP-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (pemberian radiasi UV-B tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P2 = ekspresi AP-1 pada pemberian jus buah tomat 11 g/kg/BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu dan P3 = ekspresi AP-1 pada pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu. Huruf pada grafik yang diikuti huruf sama menunjukkan bahwa antar perlakuan tersebut tidak ada perbedaan yang signifikan.

P2, dan antara P2 dan P3 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa Sel kulit menurun ekspresi AP-1 nya pada pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C) yang kandungannya setara dengan jus buah tomat 11 mg/kg BB maupun jus buah tomat. 11 mg/kg BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B (*gambar 3*).

Gambar 3 tersebut di atas diketahui bahwa Kelompok kontrol (P1) didapatkan rata-rata ekspresi paling banyak ($13,00 \pm 2,449$), dan paling sedikit ditemukan pada kelompok (P3) yakni ($3,00 \pm 1,0955$), walaupun P3 tidak berbeda signifikan dengan P2. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi AP-1 pada jaringan kulit menurun pada pemberian jus buah tomat dan pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) yang kandungannya setara dengan jus buah tomat 11 g/kg BB.

Hasil Test Imunohistokimia pada ekspresi kolagen tipe-1

Teknik imunohistokimia merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memeriksa ekspresi kolagen



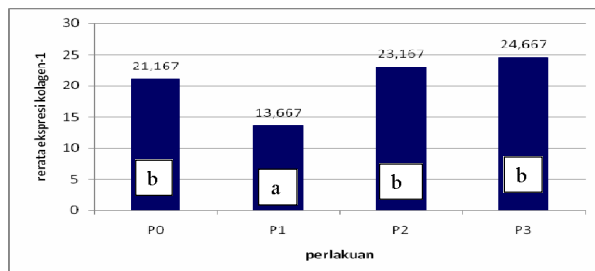
Gambar 4. Ekspresi kolagen tipe-1 jaringan kulit tikus pada berbagai perlakuan dengan teknik imunohistokimia (400 $\times$).

Keterangan: Warna coklat menunjukkan ekspresi kolagen tipe-1 (ditunjuk panah merah), warna tidak coklat (transparan) menunjukkan tidak adanya ekspresi kolagen tipe-1 (ditunjuk panah kuning). P0 = Ekspresi kolagen tipe-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (-) (tanpa radiasi UV-B dan tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P1 = Ekspresi kolagen tipe-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (+) (pemberian radiasi UV-B tanpa pemberian tomat/ antioksidan), selama 6 minggu; P2 = Ekspresi kolagen tipe-1 pada pemberian jus buah tomat 11 g/kg/BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu dan P3= Ekspresi kolagen tipe-1 pada pemberian kombinasi antioksidan (likopen, β -karoten dan vitamin C) terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu.

tipe-1 pada jaringan kulit. Identifikasi kolagen tipe-1 pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan kolagen tipe-1 pada jaringan kulit punggung tikus wistar pada semua kelompok perlakuan. Gambaran sel (gambar 4) menunjukkan bahwa sel yang tidak mengekspresikan kolagen tipe-1 akan tidak berwarna sedangkan yang mengekspresikan kolagen tipe-1 berwarna coklat, yang selanjutnya dihitung pada 20 lapangan pandang, kemudian dihitung rata-ratanya.

Gambar 4, diketahui bahwa Kelompok kontrol (+) (P1) ditemukan sel tikus berwarna coklat dengan jumlah paling sedikit, dan paling banyak ditemukan pada kelompok (P3). Kelompok P1 ditemukan sel berwarna coklat dengan jumlah lebih sedikit dibandingkan P0, P2, dan P3, Kelompok P2 ditemukan sel yang berwarna coklat dengan jumlah lebih sedikit dibandingkan P3.

Hasil anova menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,01$). Uji LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna antara P1 dengan P0, P2 dan P3, tetapi tidak ada perbedaan antara P0, P2 dan P3. Hal ini menunjukkan bahwa ada kenaikan sel kulit yang mengekspresikan kolagen tipe-1 nya pada pemberian jus buah tomat maupun pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) yang jumlahnya setara dengan yang ada di dalam jus buah tomat 11 g/kg BB, ()



Gambar 5. Grafik ekspresi Kolagen tipe-1 pada jaringan kulit pada berbagai pemberian perlakuan.

Keterangan: P0 = ekspresi kolagen tipe-1 pada sel kulit kelompok Kontrol (tanpa radiasi UV-B dan tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P1= ekspresi kolagen tipe1 pada sel kulit kelompok Kontrol (pemberian radiasi UV-B tanpa pemberian antioksidan), selama 6 minggu; P2 = ekspresi kolagen tipe1 pada pemberian jus buah tomat 11 g/kg/BB terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu dan P3 = ekspresi kolagen tipe-1 pada pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) terhadap tikus yang diradiasi UV-B, selama 6 minggu. Huruf pada grafik yang diikuti huruf sama menunjukkan bahwa antar perlakuan tersebut tidak ada perbedaan yang signifikan.

Gambar 5 menunjukkan bahwa Kelompok kontrol (P1) ditemukan ekspresi kolagen tipe-1 paling sedikit ($13,667 \pm 3,011$), dan paling banyak ditemukan pada kelompok (P3) yakni sebanyak ($24,667 \pm 2,582$) walaupun tidak berbeda signifikan dengan P2. Hal ini menunjukkan bahwa sel kulit menurun ekspresi kolagen tipe-1 nya pada pemberian jus buah tomat dengan dosis 11 mg/kg BB maupun pemberian kombinasi (likopen, β -karoten dan vitamin C mg/kg BB) yang jumlahnya setara dengan yang ada di dalam jus buah tomat 11 g/kg BB.

Radiasi sinar UV pada kulit akan diserap oleh kromofor yang merupakan permulaan reaksi fotokimiawi yang mengakibatkan penuaan kulit secara dini. Reaksi fotokimiawi ini dapat menyebabkan perubahan pada DNA, meliputi oksidasi asam nukleat. Reaksi oksidasi juga dapat mengubah protein dan lipid yang menyebabkan fungsi sel terganggu. Akumulasi keduanya menyebabkan penuaan jaringan (*tissue aging*) (Pinnel, 2003). Di dalam tubuh sebenarnya sudah dilengkapi untuk menghadapi stress oksidatif itu secara alami yakni berupa antioksidan untuk menurunkan pengaruh buruk itu, tetapi sinar UV serta pembentukan radikal bebas yang akhirnya mengakibatkan adanya kerusakan oksidatif (Dale & Pathak, 1992).

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Senyawa ini terbentuk di dalam tubuh, dipicu oleh berbagai faktor. Radikal bebas ini bisa terbentuk, misalnya ketika komponen makanan diubah menjadi bentuk energi melalui proses metabolisme. Pada proses metabolisme ini seringkali terjadi kebocoran elektron. Dalam kondisi demikian, mudah sekali terbentuk radikal bebas, seperti anion superoksida, hidroksil, dan lain-lain. Radikal juga dapat terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas. Misalnya hidrogen peroksida (H_2O_2), ozon dan lain-lain. Kedua kelompok sering disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS dapat menyebabkan kerusakan DNA, protein dan lipid pada sel. Pada penuaan biasanya terjadi peningkatan peroksidasi membran yang dapat merusak fungsi membran dan mempengaruhi fungsi fisiologis sel termasuk fungsi reseptor transmembran (Halliwell & Gutteridge, 1999). Dengan demikian, maka tingginya kadar MDA bisa dijadikan sebagai indikator tingginya aktivitas ROS di dalam dalam tubuh makhluk hidup.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA pada pemberian jus buah tomat maupun perlakuan kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C berbeda secara bermakna ($P = 0,000$) dibanding pada perlakuan kontrol positif (P1), namun tidak berbeda dengan kontrol negatif (P0). Rerata

kadar MDA pada kelompok perlakuan kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C adalah $(0,36 \pm 0,028 \mu\text{mol/mL})$ paling rendah disusul perlakuan dosis jus buah tomat 11 mg/kg BB rerata kadarnya $(0,52 \pm 0,071 \mu\text{mol/mL})$, dan berbeda secara bermakna ($p=0,000$) dibandingkan kontrol positif rerata kadarnya $(0,766 \pm 0,048 \mu\text{mol/mL})$, tetapi tidak berbeda secara bermakna dengan kontrol negatif yang rerata kadarnya $(0,44 \pm 0,059 \mu\text{mol/mL})$. Hasil ini memberikan indikasi bahwa perlakuan kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C maupun pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB pada tikus sebelum diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², dapat mencegah adanya peningkatan aktivitas ROS yang diukur melalui kadar MDA.

Pada perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C sebelum di radiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², didapatkan kadar MDA yang paling rendah dibandingkan perlakuan kontrol positif, namun tidak berbeda dengan kontrol negatif dan maupun jus buah tomat 11 g/kg BB. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C maupun pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB adalah perlakuan yang cukup efektif dalam menurunkan kadar MDA, pada tikus yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm². Hal ini disebabkan di dalam tomat selain ada bahan-bahan antioksidan seperti likopen, β -karoten, dan vitamin C, yg jumlah optimal dalam mengikat radikal bebas yang keberadaannya akibat radiasi sinar UV-B tersebut. Disamping itu juga karena masih adanya interaksi aktivitas antar antioksidan tersebut dalam meredam radikal bebas kalau masih dalam keadaan alami.

Keberadaan likopen, β -karoten dan vitamin C dalam jus buah tomat tersebut mampu mengikat radikal bebas seperti ion hidroksil maupun anion superoksida. Karena radikal ($\text{OH}^{\bullet-}$) dan ($\text{O}^{\bullet-}$) hasil pembentukan dari ROS sudah diikat terlebih dulu oleh likopen, β -karoten dan vitamin C ini sebelum merusak komponen sel seperti DNA yang berakibat pada penurunan kadar MDA. Dengan demikian maka pemberian perlakuan kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C maupun pemberian jus buah tomat dapat mencegah kenaikan MDA akibat radiasi sinar UV-B dosis 150 mJ/cm² ini. Sebagaimana penelitian (Hajar, dkk, 2005), bahwa pemberian vitamin C dapat menurunkan MDA yang diberikan kepada kelompok manula. Sedangkan Likopen adalah karotenoid yang paling efisien dalam mengubah singlet oksigen dan ROS. Dari hasil studi menunjukkan bahwa karotenoid secara signifikan dapat menurunkan MDA dan juga dengan mengkonsumsi karotenoid dapat mencegah peroksidasi lipid di dalam sel. Dengan demikian, pemberian jus buah tomat dengan kandungan didalamnya

vitamin C, likopen dan β -karoten, akan menurunkan ROS yang ditandai dengan menurunnya kadar MDA.

Aktivator Protein-1 (AP-1) merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen dan menaikkan regulasi pemecahan kolagen. Kolagen merupakan salah satu penyusun utama pada kulit tikus, yang memberikan sebagian besar kekuatan pada kulit. Bagian fibroblast menghasilkan molekul prekursor yang disebut pro-kolagen, yang selanjutnya akan diubah menjadi kolagen. Ada dua pengendali utama di dalam memproduksi kolagen yaitu: *transforming growth factor* (TGF- β) dan *activator protein* (AP-1). TGF- β merupakan sitokin yang mendorong produksi kolagen (Massague, 1998), sebaliknya AP-1 menghambat produksi kolagen. Kolagen pada kulit mengalami perubahan bentuk dan pergantian, dengan TGF- β dan AP-1 berperan penting di dalam prosesnya. TGF- β mendorong pembentukan kolagen, sedangkan AP-1 mendorong pemecahan kolagen dengan menaikkan enzim pengendali yang disebut matriks metaloproteinase (MMP) (Helfrich et al, 2008). Dengan demikian AP-1 mempunyai peran penting di dalam kerusakan kolagen pada kulit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi AP-1 pada pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C maupun pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB mengalami penurunan secara bermakna ($P = 0,000$) dibanding pada perlakuan kontrol positif (P1), maupun kontrol negatif. Rerata ekspresi AP-1 pada kelompok perlakuan kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C adalah $(3,00 \pm 1,10)$ dan perlakuan pemberian jus buah tomat dengan dosis 11 mg/kg BB rerata ekspresinya $(5,17 \pm 1,167)$ lebih rendah secara bermakna ($p = 0,000$) dibandingkan kontrol positif rerata ekspresinya $(13,00 \pm 2,45)$, dan dibandingkan kontrol negatif yang rerata ekspresinya $(6 \pm 0,82)$. Hasil ini memberikan indikasi bahwa pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi likopen β -karoten dan vitamin C pada tikus sebelum diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², dapat mencegah adanya peningkatan AP-1.

Rendahnya ekspresi AP-1 pada kelompok perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang jumlahnya setara dengan yang ada di dalam juice buah tomat 11 g/kg BB dibanding dengan perlakuan kontrol positif, maupun negatif, namun tidak berbeda dengan perlakuan pemberian jus buah tomat dosis 11 g/kg BB. ini dapat terjadi karena likopen, β -karoten dan vitamin C yang jumlahnya setara dengan yang ada di dalam juice buah tomat dosis 11 g/kg BB sudah cukup efektif dalam menurunkan ekspresi AP-1. Sedangkan pada perlakuan kontrol positif ekspresi AP-1 nya paling tinggi, karena pemberian radiasi

UV-B akan menghasilkan radikal bebas yang tinggi. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan, yang tidak berpasangan pada orbit luarnya. Molekul radikal bebas ini dapat menarik elektron dari molekul normal lain sehingga menimbulkan radikal bebas baru yang akhirnya menimbulkan efek domino (*self perpetuating process*). Radikal bebas inilah yang kemudian akan menaikkan ekspresi AP-1.

Reactive Oxygen Species (ROS) memainkan peranan penting dalam metabolisme di dalam sel, karena bisa membentuk ion hidroksil ($\bullet\text{OH}$), yakni suatu senyawa yang sangat reaktif dan berbahaya. Radiasi terhadap kulit pantat manusia menggunakan 2 MED (dua kali dosis UV-B menyebabkan kemerahan pada kulit), ternyata hal ini juga menyebabkan peningkatan pembentukan hidrogen peroksida dan ROS dalam waktu 15 menit. Dalam waktu yang sama ternyata AP-1 juga mengalami peningkatan setidaknya sampai 24 jam setelah radiasi UV-B (Fisher *et al*, 1996).

Pada perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada didalam buah tomat 11 g/kg BB maupun pemberian jus buah tomat dengan dosis 11 g/kg BB sebelum di radiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², didapatkan ekspresi AP-1 yang paling rendah dibandingkan perlakuan kontrol negatif, kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada didalam buah tomat 11 g/kg, maupun pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB adalah perlakuan yang cukup efektif dalam menurunkan ekspresi AP-1, pada tikus yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm². Hal ini disebabkan di dalam tomat selain ada berbagai bahan antioksidan seperti likopen, β -karoten, dan vitamin C, yang jumlah optimal dalam mengikat radikal bebas yang keberadaannya akibat radiasi sinar UV-B tersebut.

Keberadaan likopen, β karoten dan vitamin C tersebut mampu mengikat radikal bebas seperti ion hidroksil maupun anion superoksida. Karena radikal ($\text{OH}^{\bullet-}$) dan ($\text{O}^{\bullet-}$) hasil pembentukan dari ROS sudah diikat terlebih dulu oleh likopen, β -karoten dan vitamin C ini sebelum merusak komponen sel seperti DNA yang berakibat pada peningkatan AP-1. Dengan demikian, maka perlakuan pemberian jus buah tomat dosis 11 g/kg BB secara efektif dapat mencegah kenaikan AP-1 akibat radiasi sinar UV-B dosis 150 mJ/cm².

Hasil penelitian Choi *et al* (2006) menunjukkan bahwa radiasi sinar UV-B akan mereduksi sintesis kolagen tipe-I pada kulit fibroblast manusia melalui penghambatan terhadap ekspresi TGF- β 1 dan menstimulasi pengeluaran

MMP-1. Radiasi sinar UV menghalangi terbentuknya TGF- β , dan penghambatan ini mengurangi produksi kolagen tipe-1 pada kulit manusia yang teradiasi sinar UV-B. Kolagen tipe 1 dan 3 mengalami penurunan pada saat terjadi fotoaging pada kulit manusia. Penurunan ini dapat dihasilkan dari peningkatan kerusakan oleh metalloproteinase. Dengan demikian, maka produksi kolagen tipe-1 pada pemberian radiasi sinar UV-B amat dipengaruhi oleh MMP-1. Meningkatnya MMP-1 akan menurunkan produksi kolagen tipe-1. Dengan demikian nampak adanya hubungan antara pemberian radiasi UV-B dengan AP-1, MMP-1 dan kerusakan kolagen tipe-1.

Perlakuan pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada di dalam jus buah tomat dosis 11 g/kg BB sebelum di radiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², didapatkan ekspresi kolagen tipe-1 yang paling rendah dibandingkan perlakuan kontrol negatif, kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi ikopen, β -karoten dan vitamin C merupakan perlakuan efektif dalam menaikkan ekspresi kolagen tipe-1 pada tikus yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm². Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi kolagen tipe-1 pada pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C mengalami penurunan secara bermakna ($P = 0,000$) dibanding pada perlakuan kontrol positif (P1), namun tidak berbeda dengan perlakuan pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB, maupun dengan kontrol negatif (P0). Rerata ekspresi kolagen tipe-1 pada kelompok perlakuan pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C adalah ($24,67 \pm 2,58$) lebih tinggi dan berbeda secara bermakna ($p = 0,000$) dibandingkan kontrol positif memiliki rerata ekspresi ($13,67 \pm 3,01$), namun tidak berbeda secara bermakna dibandingkan dengan perlakuan jus buah tomat dosis 11 mg/kg yang memiliki rerata ekspresi ($23,17 \pm 3,878$), juga tidak berbeda secara bermakna dengan perlakuan kontrol negatif yang memiliki rerata ekspresi ($21,17 \pm 1,47$). Hasil ini memberikan indikasi bahwa pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C pada tikus sebelum diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², dapat mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1.

Tingginya ekspresi kolagen tipe-1 pada kelompok perlakuan pemberian jus buah tomat dosis 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada di dalam jus buah tomat dosis 11 g/kg BB dibanding dengan perlakuan kontrol positif, kontrol negatif ini karena di dalam

tomat selain ada likopen, β -karoten dan vitamin C, serta masih ada senyawa-senyawa lain baik organik maupun anorganik. Disamping itu masih adanya interaksi antara komponen anti oksidan tersebut kalau masih dalam keadaan alami. Sedangkan pada perlakuan kontrol positif ekspresi kolagen tipe-1 nya paling rendah, karena pemberian radiasi UV-B akan menghasilkan radikal bebas yang tinggi. Ekspresi kolagen tipe 1 dibawah kendali sinar ultraviolet, maka pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ini dapat mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1 sebagai akibat radiasi sinar UV-B.

Pada perlakuan pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada di dalam jus buah tomat dosis 11 g/kg BB sebelum di radiasi sinar UV-B 150 mJ/cm², didapatkan ekspresi ekspresi kolagen tipe-1 yang tinggi dibandingkan perlakuan kontrol negatif, kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian jus buah tomat 11 g/kg BB ataupun pemberian kombinasi ikopen, β -karoten dan vitamin C merupakan perlakuan efektif dalam meningkatkan ekspresi kolagen tipe-1 pada tikus yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm². Hal ini disebabkan di dalam tomat selain ada berbagai bahan antioksidan seperti likopen, β -karoten, dan vitamin C, yg jumlah optimal dalam mengikat radikal bebas yang keberadaannya akibat radiasi sinar UV-B tersebut. Disamping itu juga karena mungkin masih adanya interaksi aktivitas antar antioksidan tersebut dalam meredam radikal bebas kalau masih dalam keadaan alami.

Keberadaan likopen, β -karoten dan vitamin C dalam jus buah tomat tersebut mampu mengikat radikal bebas seperti ion hidroksil maupun anion superoksida. Karena radikal (OH[•]) dan (O[•]) hasil pembentukan dari ROS sudah diikat terlebih dulu oleh likopen, β -karoten dan vitamin C ini sebelum merusak komponen sel seperti DNA yang berakibat pada peningkatan AP-1. Dengan demikian, maka jus buah tomat dapat mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1 akibat radiasi sinar UV-B dosis 150 mJ/cm² ini. Hal ini didukung juga dari hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa kenaikan ekspresi AP-1, pada perlakuan pemberian jus buah tomat dengan dosis 11 mg/kg BB ini juga dapat dicegah.

SIMPULAN

1. Pemberian jus buah tomat pada dosis 11 g/kg BB mencegah kenaikan kadar MDA (sebagai indikator aktivitas ROS), ekspresi AP-1, dan mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1 pada kulit yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm².
2. Pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C, yang kandungannya setara dengan yang ada di dalam tomat 11 g/kg BB mencegah kenaikan kadar MDA (sebagai indikator aktivitas ROS), ekspresi AP-1, dan mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1, pada kulit yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm².
3. Pemberian kombinasi likopen, β -karoten dan vitamin C yang kandungannya setara dengan yang ada didalam jus buah tomat pada dosis 11 g/kg BB tidak memberikan efek yang berbeda dibandingkan dengan pemberian jus buah tomat pada dosis 11 g/kg BB, dalam mencegah kenaikan kadar MDA (sebagai indikator aktivitas ROS), ekspresi AP-1, dan mencegah penurunan ekspresi kolagen tipe-1 pada kulit yang diradiasi sinar UV-B 150 mJ/cm².
4. Penelitian ini menghasilkan teori baru yang menjelaskan mekanisme pencegahan kerusakan kolagen pada kulit yang diperantarai dengan pencegahan kenaikan kadar MDA (sebagai indikator ROS), ekspresi AP-1, dan pencegahan penurunan ekspresi kolagen tipe-1. Ini merupakan sumbangan baru bagi ilmu pengetahuan dan memberikan dasar ilmiah penggunaan jus buah tomat dalam memperlambat fotoaging sebagai akibat iradiasi UVB.

DAFTAR PUSTAKA

- Beckman Keneth B, Bruce N. Amies**, 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 78: 547–81.
- Choi CP, YI Kim,* JW Lee*, and MH Lee**, 2006, The effect of narrowband ultraviolet B on the expression of matrix metalloproteinase-1, transforming growth factor-b1 and type I collagen in human skin fibroblasts. *Clinical and Experimental Dermatology* 32: 180–185.
- Dalle CM, Pathak MA**, 1992. Skin Photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging, *Photochem photobiol* 1992; 14: 105–24.
- Fisher GI, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ**, 1997. Pathophysiology of Premature skin Aging induced by Ultraviolet light. *New Eng J Med*. 337: 1419–29.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ**. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*, 1996; 379: 335–9.
- Gionvannucci E**. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiological literature. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91: 317–331.

- Hajar S, Asj'ari SR, Ismadi M**, 2005. Kadar Malodialdehid Plasma dan Hemoglobin Darah setelah Pemberian Vitamin C pada Manula di Daerah Dataran Tinggi dan di Daerah Dataran Rendah. *Sains Kesehatan* 18(2), April 2005: 252–259.
- Halliwell B, Gutteridge JMC**, 1999. Oxygen is poisonous—an introduction to oxygen toxicity and free radicals. Dalam: *Free Radicals In Biology And Medicine*. 2nd ed. New York : Oxford Uni Press Inc.,: 10–2.
- Helfrich YR, Dana L, Sachs D, Voorhes JJ**, 2008. Overview of Skin Aging and Photoaging, *Dermatol NURS* 2008; 20(3): 177–183.
- Jung GE, Bohnert E**, 1995. Photobiology of ultraviolet radiation induce DNA damage, Dalam: Krutmann J and Elmetts AC, eds. *Photoimmunology*. Blackwell Science Ltd. 34–41.
- Kochevar IE**, 1995. Molecular and cellular Effect of UV radiatum Relevant to chronic photodamage. Dalam: Gilchrest B.A., *et al*. Eds. *Photodamage*. Cambridge MA: Blackwell Science: 51–67.
- Pinnell SR**, 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stres and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*; 48: 1–9.
- Pižem Jože, Andrej Cör**, 2003. Review: Detection of apoptotic cells in tumour paraffin sections. *Radiol Oncol*; vol. 37(4): 225–32.
- Sesso HD, Liu S, Gaziano JM, Buring JE**. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *J Nutr*. 2003 Jul; 133(7): 2336–41.
- Wahyono P**, 2006. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Tomat (*Lycopersicum pyriforme*) dalam Mencegah Kerusakan Hepar, Laporan Penelitian Fundamental, Lembaga Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang.
- Wahyono P**, 2009. Efek Ekstrak Buah Tomat (*Lycopersicum pyriforme*) terhadap Ekspresi kolagen tipe-1, MMP-1, MMP-3 pada Penuaan Kulit Umur Dewasa”. Abstrak Seminar Regional: Penguatan Daya Saing Bangsa Melalui Riset Berorientasi Industri dan Pengabdian Pada Masyarakat, DP2M-UMM, 23–24 Oktober 2009. ISBN: 978-979-796-143-5.
- Wahyono P**, 2008. Efek Ekstrak Buah Tomat (*Lycopersicum pyriforme*) terhadap Ekspresi kolagen tipe-1, MMP-1, MMP-3 pada Penuaan Kulit”. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* volume XXIV Nomor 3 Halaman 97–150, Malang Desember 2008, ISSN 0216-9347.
- Wahyono P**, 2009. Efek Berbagai Dosis Radiasi Sinar UV-B Terhadap Photoaging” Prosiding Seminar Nasional: Biologi, Ilmu Lingkungan dan Pembelajarannya, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta, 4 Juli 2009. ISBN: 978-602-95166-0-9.
- Yaar M, Gilchrest BA**, 2003, Aging in Skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, (eds). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 5^{ed}. New York McGraw-Hill. P1386-98.
- Yaar M, Eller MS & Gilchrest BA**, 2002. Fifty years of skin aging. *Journal of Investigative Dermatology: Symposium Proceedings*, 7(1): 51–58.
- Zakaria FR, Irawan B, Pramudya SM & Sanjaya**, 2000. “Intervensi Sayur dan Buah Pembawa Vitamin C dan E Meningkatkan Sistem Imun Populasi Buruh Pabrik di Bogor.” *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*. 11(2): 21–27.