

PENGARUH LISAT PLATELET FASE SIKLUS MENSTRUASI TERHADAP AKTIVITAS FIBROBLAS KULIT MANUSIA

Thianti Sylviningrum, Flandiana Yogianti, Sunardi Radiono, Yohanes Widodo Wirohadidjojo

*Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK Universitas Gadjah Mada/RSUP dr. Sardjito, Yogyakarta*

ABSTRAK

Lisat platelet dari platelet rich fibrin (PRF) adalah material berisi growth factors, estradiol (E2), dan leptin. Pada fase ovulasi (FO) dijumpai kadar E2, jumlah platelet, dan leukosit tertinggi, dimana interaksinya dapat menghasilkan growth factors yang meningkatkan aktivitas fibroblas dermis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek lisat platelet dari PRF fase bleeding (FB) dan FO pada aktivitas fibroblas dermis.

Biakan fibroblas dermis dibedakan menjadi 3 kelompok, biakan dalam media kultur dan fetal bovine serum (FBS) 1% sebagai kontrol negatif, biakan dalam media kultur dan FBS 10% sebagai kontrol positif. Kelompok perlakuan adalah biakan fibroblas yang diberi lisat platelet dari PRF FB dan FO 10%, 20%, dan 40% selama 72 jam.

Perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dijumpai pada rerata indeks proliferasi antara kelompok kontrol positif dengan fibroblas terpajan lisat platelet dari PRF FB dan FO 20% dibandingkan dengan kontrol negatif, serta rerata densitas optik (DO) timbunan kolagen dari fibroblas yang diberi lisat platelet dari PRF FB dan FO 20% dibandingkan dengan semua kelompok kontrol. Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada rerata indeks proliferasi dan DO timbunan kolagen antara kelompok fibroblas yang terpajan semua konsentrasi lisat platelet dari PRF FB dan FO. Peningkatan aktivitas fibroblas dermis oleh lisat platelet dari PRF FO tidak berbeda dibandingkan dengan lisat platelet dari PRF FB.

Kata kunci : *lisat platelet, platelet rich fibrin, fase bleeding, fase ovulasi, fibroblas, kolagen*

EFFECT OF PLATELET LYSATE FROM MENSTRUAL PHASE CYCLE TO HUMAN SKIN FIBROBLASTS ACTIVITIES

ABSTRACT

Platelet lysate from platelet rich fibrin (PRF) contains growth factors, estradiol (E2), and leptin. The highest level of E2, platelets, and leukocytes were found in ovulation phase (OP), which interactions will produce growth factors that may increase human dermal fibroblast activities. This study aimed to assess the effect of platelet lysate from bleeding phase (BP) and OP PRF to dermal fibroblast activities.

Fibroblast cell culture was divided to three groups; negative control group was grew in culture media and fetal bovine serum (FBS) 1%, positive control group was grew in culture media and FBS 10%. Treated group was exposed to platelet lysate from BP and OP PRF at 10%, 20%, and 40% concentrations for 72 hours.

We found significant difference ($p < 0,05$) on fibroblasts proliferation index between 20% platelet lysate from BP and OP PRF-treated groups and positive control group compared to negative control group. Collagen deposition from fibroblasts that exposed to platelet lysate from BP and OP PRF at concentration 20% was significantly different to all control groups. However, fibroblast activities among all treated groups with different concentrations were not statistically different ($p > 0,05$). We concluded there was no significant difference between dermal fibroblast activities of platelet lysate from OP PRF and BP PRF.

Keywords: *platelet lysate, platelet rich fibrin, bleeding phase, ovulation phase, fibroblast, collagen*

Korespondensi:

Jl. Karangobar no.34, Purwokerto,
Jateng, 53115.
Telp. 0281 – 636281
Email: sthianti@gmail.com
Email: widiawatyalida@gmail.com

PENDAHULUAN

Siklus menstruasi adalah siklus periodik yang dipengaruhi interaksi hormon terdiri atas fase *bleeding* (FB), fase folikuler (FF), fase ovulasi (FO), dan fase luteal (FL).^{1,2} Pada FO, kadar estradiol (E2), jumlah platelet dan leukosit lebih tinggi dibandingkan saat FB.^{3,4} Platelet dan leukosit merupakan sumber *growth factors*, antara lain *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF)- β 1, *insulin growth factor-1* (IGF-1), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF).⁵⁻⁷ Interaksi antara E2 dengan *growth factors* dapat memengaruhi aktivitas berbagai sel termasuk fibroblas kulit manusia.⁸

Platelet rich fibrin (PRF) berisi platelet, leukosit, *growth factors*, serta protein dan hormon terperangkap di dalam matriks fibrin.^{5,6,9} Lisat platelet yang berasal dari PRF merupakan bahan matriks fibrin yang lisis. Lisat platelet dapat mengandung berbagai *growth factors*, E2, dan leptin.⁹ Pelepasan *growth factors* dari matriks fibrin PRF dimulai sejak 20 menit pertama, mencapai puncaknya pada 24-72 jam, lalu menurun sampai dengan 7 hari sejak pembuatan PRF.¹⁰ Masih belum diketahui lama waktu yang dibutuhkan untuk pelepasan protein dan hormon dari matriks fibrin PRF, termasuk leptin dan E2.

Fibroblas adalah komponen seluler pada kulit manusia. Parameter aktivitas fibroblas dapat berupa peningkatan proliferasi sel dan timbunan kolagen.¹¹ Interaksi antara E2 dan *growth factors* pada biakan fibroblas dermis dapat memicu aktivitas fibroblas berupa proliferasi, diferensiasi, dan migrasi fibroblas, serta modulasi produksi kolagen dan fibronektin.^{8,12-14} Pemanfaatan fase siklus menstruasi pada PRF terhadap aktivitas fibroblas dermis belum pernah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek PRF yang berasal dari FB dan FO terhadap proliferasi fibroblas dan timbunan kolagen sebagai hasil aktivitas fibroblas kulit manusia.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental *post test only design* dengan waktu penelitian September 2014 hingga Februari 2015. Kriteria inklusi subjek donor fibroblas adalah laki-laki berusia 12-16 tahun, sehat, menjalani sirkumsisi dan bersedia sisa kulit preputium sirkumsisi digunakan untuk penelitian. Donor darah untuk pembuatan lisat platelet berasal dari 1 orang perempuan yang memenuhi kriteria inklusi sehat, tidak menggunakan kontrasepsi hormonal, dan mengalami siklus menstruasi yang teratur. Periode rekrutmen subjek donor fibroblas sumber fibroblas dan lisat platelet adalah 3 bulan. Rumus Federer digunakan untuk menentukan jumlah subjek.

Metode

Sampel penelitian adalah biakan fibroblas dermis *passage* III menggunakan teknik *explant*. Fibroblas berasal dari *preputium* sirkumsisi yang diisolasi dari 4 orang subjek donor fibroblas setelah menandatangani *informed consent*. Fibroblas dibiakkan dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)-SigmaTM dengan tambahan 10% *fetal bovine serum* (FBS), 1000 μ g/100 unit Pen Strep (Gibco[®], California, Amerika Serikat); *Fungizone* 1000 μ g/ml (Gibco[®], California, Amerika Serikat); dan 100 mg/ml *Ceftriaxone* (Phapros[®], Indonesia). Suspensi fibroblas berisi 5×10^3 sel dari masing-masing subjek yang diteteskan pada tiap sumuran yang berbeda dari *microplate* berisi 96 sumur (IwakiTM, Jepang).

Kelompok penelitian dibagi menjadi kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol positif adalah biakan fibroblas yang diberi DMEM dan FBS 10%. Kelompok kontrol negatif berupa biakan fibroblas dalam DMEM dan FBS 1%. Enam kelompok perlakuan, yaitu biakan fibroblas yang diberi DMEM dan lisat platelet dari PRF FB dan FO konsentrasi 10%, 20%, dan 40%. Setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Semua kelompok diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Selanjutnya media pada seluruh kelompok dibuang dan diganti *phosphat buffer saline* (PBS). Tahap berikutnya adalah penilaian proliferasi sel dengan *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide* (MTT) *assay* dan *sirius red* untuk menilai timbunan kolagen.

Pengukuran kadar E2 serum dan pembuatan PRF sesuai Choukroun¹⁵

Darah vena dari subjek donor fibroblas perempuan sehat diambil sebanyak 20 mililiter (ml) pada pagi hari antara pukul 8-9. Pengambilan darah dilakukan pada FB yaitu 24-48 jam pertama setelah menstruasi hari pertama dan FO siklus menstruasi. Konfirmasi FO dilakukan dengan tes saliva yang dilakukan sebelum pengambilan darah. Pada FO, pemeriksaan saliva menggunakan mikroskop akan menunjukkan gambaran daun pakis. Selanjutnya, darah vena dimasukkan ke dalam tabung gelas tanpa antikoagulan, lalu disentrifugasi pada 400 G selama 10 menit, sehingga terbentuk 3 lapisan pada tabung gelas. Bagian teratas merupakan serum, diambil 1 ml untuk pemeriksaan E2 menggunakan *Cobas Elecsys*[®] (RocheTM). Hasil pengukuran kadar E2 dinyatakan dalam satuan pg/ml.

Lapisan tengah merupakan PRF berupa bekuan fibrin, lapisan ini dipisahkan dari lapisan terbawah. Bekuan fibrin dimasukkan ke dalam tabung gelas baru lalu disimpan pada suhu -4°C selama 24 jam. Pasca inkubasi selama 24 jam akan terbentuk lisat platelet, yang selanjutnya akan disimpan pada suhu -20°C sampai dipaparkan pada kelompok perlakuan. Lisat platelet dari

yang berasal FB dan FO tersebut dibuat dalam konsentrasi 10%, 20%, dan 40%.

Penilaian proliferasi fibroblas menggunakan MTT assay

Pengukuran proliferasi fibroblas menggunakan MTT assay dimulai dengan membuang semua medium yang tersisa dalam sumuran di *microwell plate*, lalu 50 μ l MTT dan 200 μ l medium baru ditambahkan dalam tabung. Selanjutnya, *microplate* dibungkus dengan kertas *aluminium foil*, dan diinkubasi selama 4-8 jam, lalu MTT dan medium dibuang. Langkah berikutnya, ditambahkan 200 μ l DMSO dan 25 μ l glisin *buffer* pada setiap sumuran, lalu proliferasi fibroblas dinilai dengan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm.

Pengukuran Timbunan Kolagen

Pengukuran timbunan kolagen dimulai dengan membuang medium dalam setiap sumuran *microplate*, kemudian setiap sumuran dicuci dengan PBS 200 μ L. Selanjutnya, biakan fibroblas difiksasi dengan *Bouin solution* selama 1 jam, kemudian dicuci dengan air mengalir sampai warna kuning hilang. *Sirius red* ditambahkan sebanyak 200 μ L ke dalam setiap sumuran lalu diinkubasi selama 1 jam. *Sirius red* dibuang dan

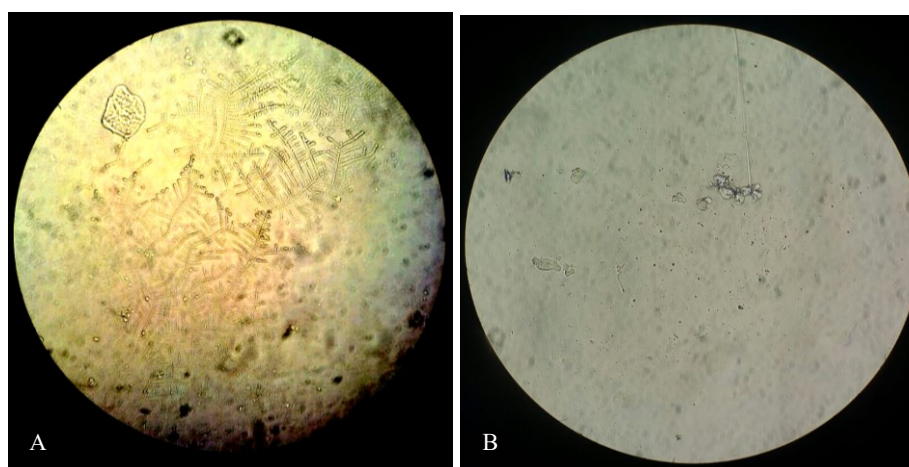
sumuran dicuci dengan HCl 0,1 N sampai *sirius red* hilang dari supernatan dan dinding sumuran. Selanjutnya, ditambahkan 200 μ l NaOH 0,5 N dan dibiarkan selama 30 menit, dilanjutkan pembacaan dengan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan program komputer *statistical package for the social sciences* (SPSS) versi 20. Perbedaan proliferasi sel fibroblas dan densitas optik (DO) timbunan kolagen dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis dengan uji *one way anova* bila sebaran data normal. Uji *post hoc* menggunakan *least square difference* (LSD) dilakukan bila hasil uji *one way anova* menunjukkan nilai $p < 0,05$. Bila sebaran data tetap tidak normal walaupun telah dilakukan normalisasi data, maka analisis data dilakukan dengan uji Friedman, dilanjutkan uji Wilcoxon sebagai *post hoc test* bila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Pemeriksaan kadar E2 serum dari subjek donor fibroblas pada FB mendapatkan 42,05 pg/ml dan pada FO sebesar 310,08 pg/ml. Perbedaan gambaran daun pakis pada pemeriksaan saliva subjek donor fibroblas pada saat FB dan FO dapat dilihat pada gambar 1.

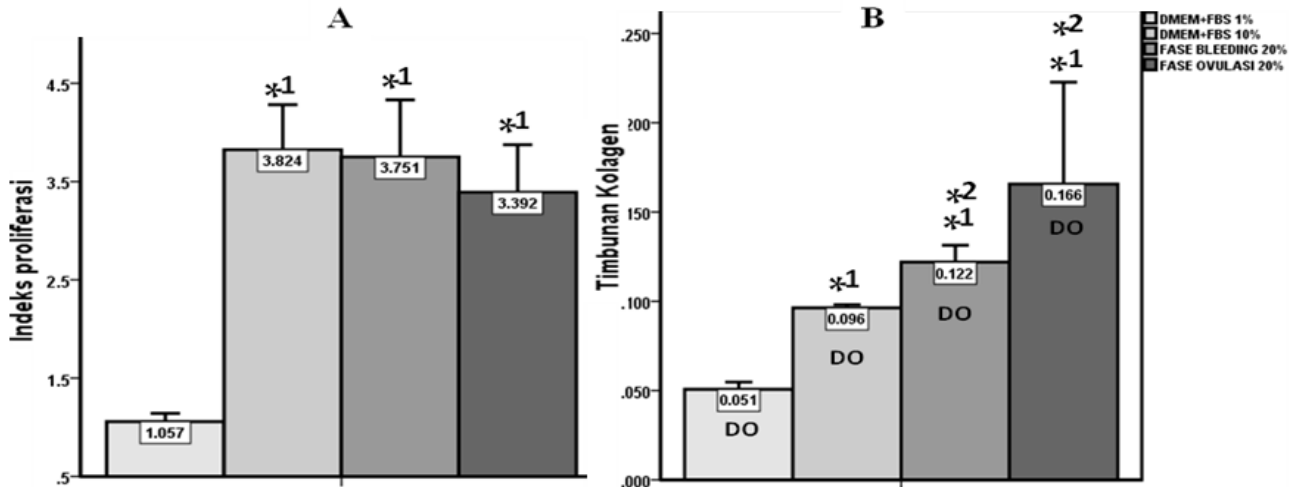


Gambar 1. Hasil tes saliva subjek donor fibroblas dari fase ovulasi (A) dan fase *bleeding* (B)

Rerata proliferasi sel dan DO timbunan kolagen dari kelompok fibroblas yang terpajan lisat platelet dari PRF FB dan FO 20% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan negatif dapat dilihat pada gambar 2.

Hasil uji Friedman menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) pada rerata indeks proliferasi sel dan DO timbunan kolagen dari kelompok kontrol negatif dan biakan fibroblas yang diberi lisat platelet dari PRF FB dan FO. Pada hasil uji Wilcoxon diperoleh perbedaan bermakna

($p < 0,05$) antara rerata indeks proliferasi sel pada kelompok kontrol positif dan biakan fibroblas yang diberi lisat platelet dari PRF FB dan FO konsentrasi 20% dibandingkan dengan kontrol negatif. Densitas optik timbunan kolagen pada fibroblas yang terpajan lisat platelet dari PRF FB dan FO konsentrasi 20% menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan negatif (gambar 2).

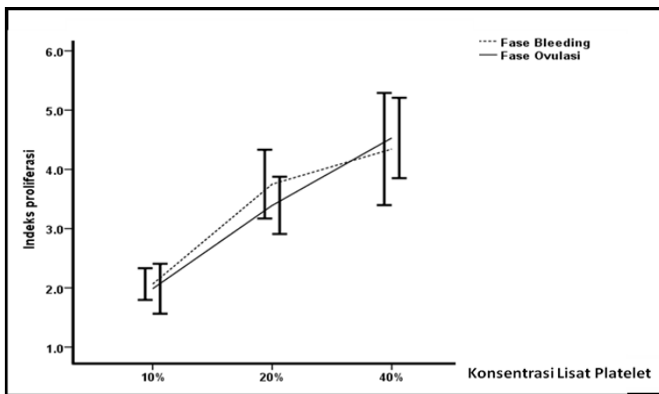


*1 = $p < 0.05$ (Uji Wilcoxon terhadap DMEM dan FBS 1%)
 *2 = $p < 0.05$ (Uji Wilcoxon terhadap DMEM dan FBS 10%)

Gambar 2. Pengaruh lisat platelet dari PRF fase *bleeding* dan fase ovulasi terhadap indeks proliferasi sel (A) dan timbunan kolagen (B)

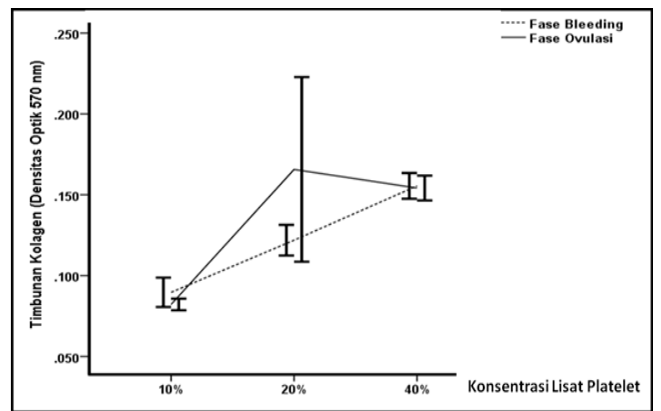
Keterangan gambar : DMEM : Dulbecco’s Modified Eagle Medium; FBS: *Fetal Bovine Serum*; DO : Densitas Optik

Peningkatan konsentrasi lisat platelet dari PRF FB dan FO pada biakan fibroblas dermis menunjukkan peningkatan proliferasi sel dan DO timbunan kolagen (gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Perbandingan rerata indeks proliferasi sel pada biakan fibroblas kulit manusia yang diberi berbagai konsentrasi lisat platelet dari PRF fase *bleeding* (FB) dan fase ovulasi (FO)

Hasil uji Wilcoxon menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada rerata indeks proliferasi sel dan DO timbunan kolagen antara kelompok biakan fibroblas yang terpajan lisat platelet dari PRF FB dan FO konsentrasi 10%, 20%, dan 40% (gambar 3 dan 4).



Gambar 4. Perbandingan rerata densitas optik timbunan kolagen dari biakan fibroblas kulit manusia yang diberi berbagai konsentrasi lisat platelet dari PRF fase *bleeding* dan fase ovulasi

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, fase ovulasi dari subjek donor fibroblas ditandai dengan gambaran pakis pada pemeriksaan saliva dan kadar E2 serum yang lebih tinggi daripada FB. Estradiol dapat berikatan dengan *estrogen receptor* (ER)- β pada permukaan platelet, sehingga aktivitas platelet dapat meningkat. Estradiol juga dapat

meningkatkan migrasi leukosit dari sumsum tulang ke darah perifer.^{4,16} Jumlah platelet dan leukosit pada FO lebih tinggi dibandingkan FB, sedangkan jumlah neutrofil, limfosit dan monosit tidak berbeda bermakna antara FO dan FB.⁴

Platelet dapat mengaktivasi leukosit melalui produksi *platelet-released adenin nucleotides* dan PDGF. Leukosit yang aktif dapat mensekresi O_2^- , *platelet-activating factor* (PAF), elastase, dan *capthesin G* yang dapat meningkatkan aktivasi dan sekresi dari platelet.¹⁷ Neutrofil, limfosit dan monosit merupakan sumber TGF- β 1 dan VEGF.^{10,18,19} Platelet dapat memproduksi *growth factors* antara lain PDGF, bFGF, dan TGF- β 1 yang saling berinteraksi dan memberi efek sinergis, sedangkan TGF- β 1 telah diketahui mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas dermis.¹²⁻¹⁴ Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna antara rerata indeks proliferasi sel fibroblas dermis yang terpajan lisat platelet dari PRF FB dan FO. Hal ini kemungkinan karena leukosit pada PRF dari FB mampu memproduksi TGF- β 1 dan VEGF yang selanjutnya berinteraksi dengan produk dari platelet, dan kemudian dilepas ke lisat platelet. Biakan fibroblas dermis yang terpajan lisat platelet dari PRF tersebut akan memacu proliferasi fibroblas dalam jumlah yang hampir sama dengan kelompok fibroblas yang terpajan lisat platelet dari PRF FO.

Lisat platelet dapat berisi E2 dan *growth factors* yang dilepaskan perlahan dari matriks fibrin PRF.^{9,10} Belum pernah dilakukan penelitian tentang durasi waktu pelepasan E2 dari platelet pada PRF dan kuantifikasi kadar E2 pada lisat platelet berdasarkan fase siklus menstruasi. Lisat platelet dari aferesis unit platelet subjek donor fibroblas berusia < 35 dan > 45 tahun menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna dari komponen PDGF, IGF-1, bFGF, TGF- β 1, E2 dan leptin serta efek proliferasinya terhadap *mesenchymal stem cells*.⁹ Hasil penelitian tersebut dapat menggambarkan pada populasi yang berusia < 35 tahun dengan mayoritas individu berada dalam fase usia produktif, menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada kadar hormon dan GF pada kelompok usia > 45 tahun. Ikatan antara E2 dengan ER- β pada permukaan fibroblas dapat meningkatkan ekspresi TGF- β 1, serta migrasi dan proliferasi sel, walaupun dapat tanpa diikuti peningkatan sekresi kolagen.²⁰ Hal tersebut mendukung hasil penelitian ini, yaitu tingkat proliferasi sel fibroblas tidak terkait dengan fluktuasi kadar hormon dalam kadar tertentu. Penelitian adalah yang pertama untuk membandingkan kualitas lisat platelet pada aktivitas fibroblast dermis dari fase menstruasi yang berbeda yaitu FO dan FB.

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan DO timbunan kolagen yang bermakna antara kelompok biakan fibroblas yang terpajan PRF FO dan FB dengan kelompok kontrol negatif. Pada PRF, terjadi peningkatan jumlah platelet, sedangkan platelet mengekskresikan

reseptor leptin pada permukaan selnya.^{21,22} Komponen leptin dapat dijumpai pada lisat platelet.⁹ Paparan leptin pada biakan fibroblas dermis terbukti meningkatkan sekresi kolagen dan asam hialuronat oleh fibroblas.²³ Pada penelitian ini, kemungkinan terdapat leptin pada lisat platelet dari PRF sehingga terjadi peningkatan produksi kolagen.

Pajanan E2 pada konsentrasi tertentu dan *growth factors* pada biakan fibroblas dermis dapat meningkatkan proliferasi fibroblas yang diikuti peningkatan sintesis kolagen tipe I, menghambat ekspresi *matrix metalloproteinase* (MMP)-1, tetapi sintesis *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) -1 tidak terhambat.^{24,25} Hal tersebut dapat menjelaskan hasil penelitian ini, yaitu peningkatan timbunan kolagen terjadi melalui efek E2 pada lisat platelet yang mungkin dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan produksi prokolagen I, serta penekanan produksi MMP-1 oleh fibroblas dermis. Perbandingan DO timbunan kolagen pada biakan fibroblas dermis yang terpajan PRF dari FO dan FB siklus menstruasi pada penelitian ini, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil tersebut dapat disebabkan oleh tingkat proliferasi sel fibroblas yang tidak berbeda bermakna pada biakan fibroblas yang terpajan lisat platelet dari PRF FO dan FB siklus menstruasi serta kemungkinan E2 bukan sebagai faktor utama yang dapat menginduksi proliferasi fibroblas dan meningkatkan timbunan kolagen. Keterbatasan penelitian ini adalah tidak mengukur dan membandingkan jumlah leukosit, trombosit, serta kadar E2 dari darah serta lisat platelet pada FO dan FB. Hal ini menyebabkan pertanyaan yang muncul tentang kemungkinan faktor selain E2 yang mempengaruhi aktivitas fibroblas dermis belum terjawab.

SIMPULAN

Lisat platelet dari PRF fase ovulasi (FO) meningkatkan aktivitas fibroblas kulit manusia tidak lebih baik daripada lisat platelet dari PRF fase *bleeding* (FB). Berdasarkan hal tersebut pemanfaatan PRF untuk terapi berbagai kondisi medis dapat dilakukan tanpa mempertimbangkan fase siklus menstruasi. Namun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menilai kadar E2, platelet, dan leukosit dari lisat platelet FO dan FB untuk mengetahui efek lisat platelet tersebut pada aktivitas fibroblas dermis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Scanlon VC, Sanders T. The reproductive systems. Dalam: *Essential of Anatomy and Physiology*. Edisi ke-5. Boston: F.A Davis Company; 2007. h.467-70.
2. Fehring RJ, Schneider M, Raviele K. Variability in the phases of the menstrual cycle. *JOGNN*. 2006;35:376-84.

3. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013;19:197–209.
4. Rajnee, Chawla VK, Choudhary R, Binawara BK, Choudhary S. Haematological and electrocardiographic variations during menstrual cycle. *Pak J Physiol*. 2010;6:18-21.
5. Hotwani K, Sharma K. Platelet rich fibrin - a novel acumen into regenerative endodontic therapy. *Restor Dent Endod*. 2014;39:1-6.
6. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, dkk. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng*. 2011;17:349-59.
7. Rosin C, Brunner M, Lehr S, Quehenberger P, Panzer S. The formation of platelet-leukocyte aggregates varies during the menstrual cycle. *Platelets*. 2006;17:61–6.
8. Soldano S, Montagna P, Brizzolara R, Sulli A, Parodi A, Serio B. Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1193:25–9.
9. Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, Jousen S, Drescher W, Jockenhoevel S, dkk. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2012;7:e37839.
10. Ehrenfest DMD, De Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27:63-9.
11. Krieg T, Aumailley M, Koch M, Cu ML, Uitto J. Collagen, elastic fibers, and other extracellular matrix proteins of the dermis. Dalam: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, penyunting. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. Edisi ke-8. New York: McGraw-Hill Companies; 2012.h. 667-79.
12. Dallon JC, Sherratt JA, Maini PK. Modeling the effects of transforming growth factor- β on extracellular matrix alignment in dermal wound repair. *Wound Rep Reg*. 2001;9:278–86.
13. Wara-Ladykowska JC, Gore EA, Shegogue DA, Smith EA, Trojanowska M. Differential regulation of transforming growth factor- β receptors type I and II by platelet-derived growth factor in human dermal fibroblasts. *BJD*. 2001;145:569-75.
14. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Epidermal growth factor induces fibronectin expression in human dermal fibroblasts via protein kinase c signaling pathway. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1390–8.
15. Khetawat SV, Tari RN. Platelet-rich fibrin as a biofuel for tissue regeneration. *ISRN Biomaterials*. 2013;1-6.
16. Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, dkk. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor β and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood*. 2000;95:2289-96.
17. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2702-8.
18. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.
19. Grotendorst GR, Smale G, Pincev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol*. 1989;140:396-402.
20. Stevenson S, Nelson LD, Sharpe DT, Thornton MJ. 17 β -Estradiol regulates the secretion of TGF- β by cultured human dermal fibroblasts. *J Biomater Sci Polymer Edn*. 2008;19:1097–109.
21. Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol*. 2010;81:546-55.
22. Giandemonico G, Dellas C, Czekay RP, Koschnick S, Loskutoff DJ. The leptin receptor system on human platelets. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1042–9.
23. Ezure T, Amano S. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. *BioFactors* 31. 2007:229–36.
24. Philips N, Devaney J. Beneficial regulation of type 1 collagen and matrix metalloproteinase-1 expression by estrogen, progesterone, and its combination in skin fibroblasts. *J Amer Aging Assoc*. 2003;26:59-62.
25. Qu L, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Effects of 17 β -estradiol on matrix metalloproteinase-1 synthesis by human dermal fibroblasts. *Maturitas*. 2006;54:39-46.