

## Pengaruh Superoksida Dismutase Rekombinan *Staphylococcus equorum* Terhadap Viabilitas Sel dan Deposisi Kolagen Pada Sel Fibroblas 3T3 Yang Dipaparkan UVA

Ana Indrayati<sup>1</sup>, Sukmadaja Asyarie<sup>2</sup>, Tri Suciati<sup>2</sup> dan Debbie Soefie Retnoningrum<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jalan Letjen Sutoyo Mojosongo Surakarta, 57127

<sup>2</sup>Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung, 40132

E-mail: [retnoningrum@indo.net.id](mailto:retnoningrum@indo.net.id)

---

### Abstrak

UVA merupakan faktor eksternal utama penyebab penuaan kulit. UVA meningkatkan produksi matrik metalloproteinase (MMP) yang mendegradasi kolagen tidak langsung melalui pembentukan *reactive oxygen species*. Superoksida dismutase (SOD) mengkatalisis perubahan anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. SOD dapat digunakan sebagai komponen kosmetik untuk mencegah penuaan kulit. Tujuan penelitian ini adalah, mengetahui pengaruh rSOD *S. equorum* dalam meningkatkan deposisi kolagen pada sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan UVA.

Penelitian diawali dengan konfirmasi *E. coli* BL21(DE3) yang membawa pJExpress<sup>®</sup>414-sod. Overproduksi rSOD dilakukan dengan IPTG hingga konsentrasi akhir 1 mM selama 4 jam pada suhu 37°C. Pemurnian rSOD dilakukan menggunakan kromatografi afinitas kolom nikel dengan gradien konsentrasi imidazol untuk elusi. Viabilitas sel ditentukan menggunakan Alamar blue, sedangkan deposisi kolagen dengan Sirius red.

Hasil uji menunjukkan bahwa, paparan UVA selama 45 menit pada sel dengan 4, 8, dan 16 unit rSOD tidak mempengaruhi viabilitas sel secara bermakna. Namun, mampu meningkatkan deposisi kolagen berturut-turut sebesar 3,02%; 20,03% dan 35,75% dibandingkan dengan sel tanpa rSOD. Hasil ini menunjukkan bahwa rSOD mempunyai potensi sebagai agen anti fotoaging.

**Kata kunci:** rSOD *S. equorum*, fibroblas 3T3, UVA, viabilitas sel, deposisi kolagen

---

### Abstract

UVA is the main external factors causing skin aging. UVA increase matrix metalloproteinase (MMP) synthesis that degrade collagen indirectly through reactive oxygen species. Superoksida dismutase (SOD) catalyzes the conversion of superoxide anions to hydrogen peroxide and oxygen. SOD can be used as a cosmetic's component to prevent skin aging. The objective of this research is to determine rSOD *S. equorum* ability to increase collagen deposition using fibroblast 3T3 against UVA.

The research was initiated by the confirmation of *E. coli* BL21(DE3) carrying pJExpress<sup>®</sup>414-sod. rSOD was overproduced in *E. coli* BL21(DE3) by IPTG induction to a final concentration of 1 mM for 4 hours at 37°C. rSOD purification was done using an Ni-NTA affinity column with gradient imidazole concentrations for elution. Various concentrations of rSOD was added to fibroblast 3T3 cell culture after UVA irradiation to determine its role in collagen deposition. The effect of rSOD was analyzed by fibroblast viability using Alamar blue and collagen deposition with picro sirius red.

The results showed that fibroblast cell viability exposed with UVA for 45 minutes in the presence of 4, 8, and 16 unit rSOD was not significantly affected, however, the collagen deposition was significantly increased about 3.02%; 20.03% and 35.75% respectively compared to cell without rSOD. This result indicates that rSOD is a good candidate for an anti photoaging agent.

**Key word:** rSOD *S. equorum*, fibroblast 3T3, UVA, cell viability, collagen deposition

---

## Pendahuluan

Kulit merupakan organ tubuh terluar dan terluas sebagai pelindung dari paparan sinar matahari, infeksi mikroba, suhu ekstrim, dehidrasi, dan trauma mekanik (Rabe *et al.* 2006). Kulit tersusun atas tiga lapisan yaitu epidermis, dermis dan hipodermis. Pada lapisan dermis terdapat kolagen, elastin, glikosaminoglikan, dan proteoglikan yang dihasilkan dan disekresikan oleh sel fibroblas menuju lingkungan ekstrasel untuk menjaga integritas dan struktur kulit (Park & Hwang 2011). UVA merupakan faktor eksternal utama penyebab penuaan kulit (fotoaging) melalui pembentukan ROS. Fotoaging ditandai oleh pigmentasi tidak merata, kulit kering, kasar, pucat, berkerut serta penurunan kekuatan dan elastisitas (Lyons & Brien 2002).

Mekanisme fotoaging belum diketahui secara pasti, diduga paparan UVA pada kulit memicu produksi ROS yang dapat meningkatkan ekspresi gen pengkode matrik metalloproteinase (MMP). MMP (EC:3.4.24.X-Y) adalah Zn-protease yang mendegradasi kolagen, elastin, dan protein-protein lain di jaringan ikat serta tulang. MMP berperan dalam embriogenesis, penyembuhan luka, angiogenesis, peradangan, dan perkembangan kanker. MMP dihasilkan sebagai zimogen oleh sel fibroblas, keratinosit, endotel, mastosit, eosinophil, osteoblas, makrofag, dan limfosit (Walterova *et al.* 2006). Aktivitas enzim proteolitik seperti serin protease, furin dan plasmin membantu menghasilkan MMP aktif. Aktivitas MMP diregulasi oleh *tissue inhibitors of matrix*

*metalloproteinase* (TIMP) endogen yang terdiri dari TIMP-1, 2, 3, dan 4. Inaktivasi TIMP oleh ROS menginduksi sintesis MMP (Quan *et al.* 2009).

Tubuh manusia memiliki sistem pertahanan antioksidan untuk melawan dampak negatif radikal bebas. SOD merupakan garis depan sistem pertahanan yang berfungsi mengkatalis dismutasi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. SOD dikelompokkan menjadi empat tipe berdasarkan kofaktor logamnya yaitu mangan (MnSOD), besi (FeSOD), tembaga-seng (CuZnSOD) dan nikel (NiSOD). Kemampuan SOD untuk mengeliminasi radikal bebas dalam jumlah yang berlebih dimanfaatkan sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik untuk mengatasi penuaan dini dan saat ini banyak dilakukan penelitian penggunaan SOD untuk tujuan terapeutik penyakit-penyakit karena tekanan oksidatif.

Berdasarkan penelitian sebelumnya Indrayati *et al.* (2014), rekombinan SOD (rSOD) *S. equorum* relatif stabil terhadap pengaruh berbagai faktor lingkungan seperti suhu, pH, reduktor, oksidator, deterjen, dan paparan sinar UV. Berdasarkan karakter tersebut rSOD *S. equorum* sangat berpotensi sebagai bahan aktif untuk kosmetik anti penuaan dini, namun mekanisme SOD dalam melindungi kolagen dari paparan UVA belum diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh rSOD *S. equorum* dalam memberikan perlindungan terhadap kolagen dari paparan UVA. Parameter yang akan ditentukan adalah viabilitas

sel dan deposisi kolagen dari sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan UVA *in vitro*.

### Metode Penelitian

#### Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah perangkat elektroforesis Mini Protean II (Bio-Rad), tabung kultur sel 25 dan 175 cm<sup>2</sup> (Thermo Scientific™ Nunc™), pelat ELISA 96 sumur ([Nunc-Immuno™ MicroWell™](#)), tabung Falcon 15 dan 59 ml (Thermo Scientific™ Nunc™), pipet ukur 10 ml (Pyrex®), hemositometer (Neubauer), 24 sumur pelat kultur jaringan (Thermo Scientific™ Nunc™), *cryotube* (Life Technology, Inc). sentrifuga (Mikro 200R Allegra X-15R Centrifuge Beckman), pH meter (Mettler Toledo S20), autoklaf (ALP Co. Ltd., Jepang), inkubator goyang 37°C (GSL), timbangan elektrik (Sartorius BP3105), lemari pendingin 4°C (Sharp), lemari pendingin -20°C (Denpoo), lemari pendingin -80°C (Life Technology, Inc.), tabung sentrifugasi protein (Beckman DU7500i), sonikator (Fisher Sonic Dismembrator Model 300), inkubator CO<sub>2</sub> (Esco), mikroskop *inverted* (Olympus TH4-200), membran dialisa (MD Bio), tabung Nanosep (PALL, Life Sciences), jarum suntik berbagai ukuran, membran mikro filter 0,45 dan 0,22 µM (Sartorius Stedim Biotech, Jerman), lampu spiritus, lampu UV 254 dan 365 nm (Vilbert Lourmat-6.LC, Perancis),

#### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *E.*

*coli* BL21(DE3) yang membawa pJExpress®414-*sod* digunakan untuk overproduksi rhybSOD, Sel lini BALB/c fibroblas 3T3 (ATCC). Bahan-bahan kimia yang terdiri dari: bakto agar (Difco), tripton (Difco), ekstrak ragi (Difco), (Merck), glisin (Promega), IPTG (Sigma), fenil metil sulfonil florida (PMSF) (Bio Basic, Inc), SDS (Promega), akrilamid-bisakrilamid (Promega), amonium persulfat (APS) (Merck), tris basa (Promega), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Pharmacia), marka protein *unstained* (Amersham), kit pemurnian protein resin Ni<sup>2+</sup>-NTA (Amersham), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck), imidazol (Bio Basic Inc), asam klorida (HCl) (Merck), natrium hidroksida (NaOH) (Merck), metanol (Merck), dan asam asetat glasial (Merck). Albumin serum sapi (Invitrogen), larutan Bradford (Biorad), DTT (Merck), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), penisilin-streptomisin (Invitrogen), *Hanks' balanced salt solution* (HBSS) (Invitrogen), Alamar Blue® (Invitrogen), sirius red (asam pikrat, *fast green, direct Red 80*, Sigma), tripsin (Invitrogen), FBS (Invitrogen,) (Invitrogen), alkohol 70%, alkohol 95%, lisol, aluminium foil, spiritus, sarung tangan, masker, kertas tisu, akuades steril, dan akuadeion steril.

#### Jalannya penelitian

Sel Fibroblas 3T3 yang digunakan dalam penelitian ini dalam bentuk beku sehingga sel harus dicairkan terlebih dahulu untuk mengaktifkan kembali sel (*thawing*). Sel fibroblas 3T3 ditumbuhkan dalam *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung 4,5 g/L D glukosa, 2

mmol/L L-glutamin, 100 µg/L streptomisin, 100 unit/L penisilin, dan 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Sel diinkubasi pada suhu 37 C dengan kelembaban 5% CO<sub>2</sub> selama 72 jam. Setelah sel mencapai kepadatan 80%, sel disubkultur ke dalam 24 *well tissue culture plate*. Jumlah sel yang dimasukkan ke dalam sumur ditentukan dengan pewarna Tripkan blue 0,4% menggunakan bilik hitung *improved Neubauer* (hemositometer). Jumlah sel yang dimasukkan ke dalam masing-masing sumur adalah 1 ml kultur sel dengan konsentrasi akhir 1x10<sup>5</sup> sel/ml.

Sel dipaparkan UVA selama 45 menit pada jarak 5 cm kemudian sebanyak 4, 8, dan 16 U/ml rSOD digunakan untuk mempelajari pengaruh rSOD terhadap viabilitas sel dan deposisi kolagen. Kontrol yang digunakan adalah sel fibroblas 3T3 tanpa rSOD. Viabilitas sel ditentukan dengan pereaksi Alamar blue menggunakan spektrofotometer UV-Vis

570 nm, sedangkan deposisi kolagen ditentukan dengan pereaksi sirius red pada 550 nm. Pada penelitian ini masing-masing kelompok dilakukan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan *one way ANOVA* menggunakan program Graphad Instat 3.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **Pengaruh rSOD terhadap viabilitas sel fibroblas 3T3**

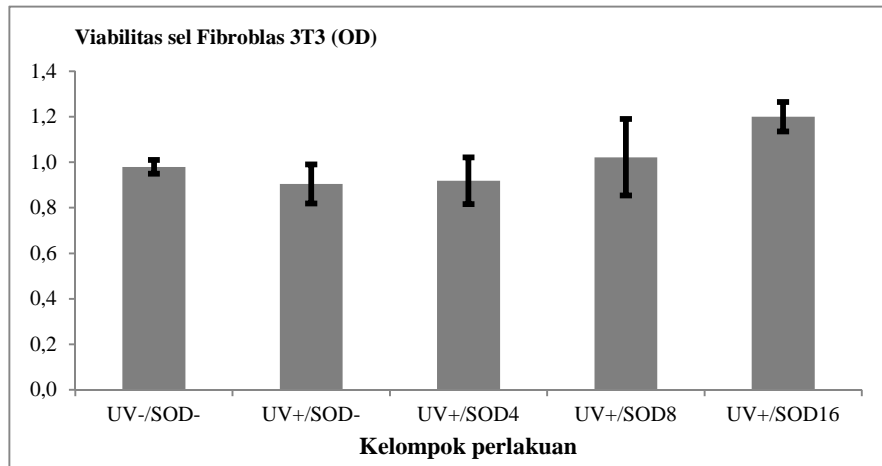
Paparan UVA selama 45 menit pada jarak 5 cm dengan penambahan 4, 8, dan 16 U/ml rSOD menyebabkan viabilitas sel tidak berbeda nyata dibandingkan sel tanpa rSOD. Viabilitas sel relatif masing-masing grup adalah

UV-/SOD- (97%); UV+/SOD- (90,5%); UV+/SOD4 (91,8%); UV+/SOD8 (98%) dan UV+/SOD16 (99%) (Gambar.1). Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan fungsi metabolismenya. Viabilitas sel yang tinggi menentukan keberhasilan kultur sel. Viabilitas sel ditentukan dengan pewarnaan Alamar blue yang bersifat impermeabel terhadap membran sel. Peningkatan permeabilitas membran sel mengakibatkan trypan blue dapat masuk ke dalam sel.

Sel hidup berbentuk bulat utuh dan berwarna jernih sedangkan sel mati berwarna biru akibat masuknya pewarna trypan blue (Skowron & Lidia 2004). Berdasarkan Gambar. 1, diketahui bahwa paparan UVA selama 45 menit menurunkan viabilitas sel namun pemberian rSOD mampu mengembalikan viabilitas sel tersebut yang menunjukkan bahwa rSOD mampu melindungi sel dari paparan UVA. Hal ini diperkuat oleh penelitian Sasaki *et al* (2002) yang menyatakan bahwa SOD mampu memberikan perlindungan terhadap sel lini HaCaT dari paparan sinar UVB, meskipun mekanisme molekulernya belum diketahui.

#### **III.2 Pengaruh rSOD terhadap deposisi kolagen**

Peningkatan jumlah rSOD pada sel yang dipaparkan UVA menaikkan jumlah kolagen secara bermakna dibandingkan dengan sel tanpa rSOD (Gambar. 2). Sekitar 95% radiasi UV yang mencapai bumi terdiri dari sinar UVA. Intensitas sinar UVA untuk mencapai lapisan dermis 1000 kali lebih besar dibandingkan sinar UVB di



**Gambar.1 Pengaruh rSOD terhadap viabilitas sel**

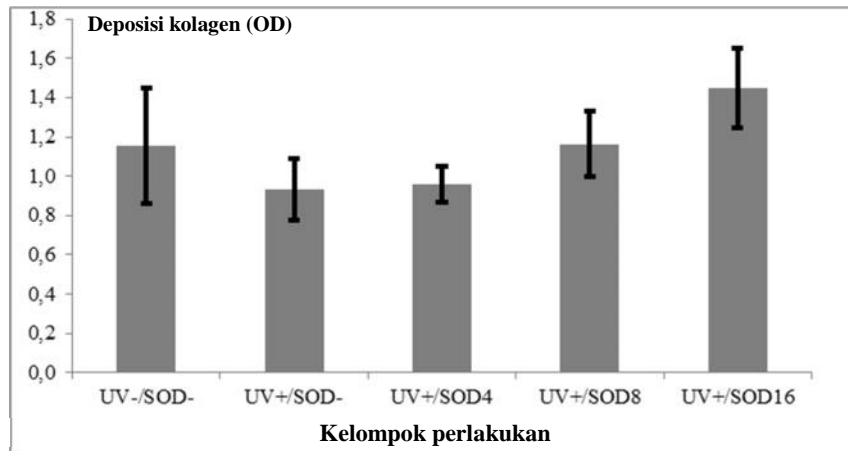
dalam lapisan dermis terdapat sel-sel fibroblas sebagai sel utama penghasil kolagen yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit.

Matriks ekstraseluler dermis tersusun atas kolagen tipe 1 (80-85%), elastin, fibronectin, dan proteoglikan (Tiedtke *et al.* 2007). Kolagen merupakan komponen utama matriks ekstrasel yang sebagian besar disintesis di dalam sel fibroblas. Kolagen didegradasi oleh MMP menjadi gelatin selanjutnya oleh gelatinase dipecah dan disekresi ke luar tubuh (Xu *et al.* 2004).

Radiasi UVA menghasilkan ROS yang dapat mengaktifasi reseptor sitokin dan faktor pertumbuhan pada membran sel fibroblas. Aktivasi reseptor menginduksi sinyal intraseluler MAP kinase yang selanjutnya mengaktifasi kompleks faktor transkripsi nukleus *activator protein-satu* (AP-1). Aktivasi AP-1 berlebihan pada sel fibroblas menyebabkan peningkatan ekspresi

gen MMP-1 (kolagenase), MMP-3 (stromelisin) dan MMP-9 (gelatinase) yang dapat merusak kolagen dan protein-protein lain pada dermis. Selain itu aktivasi AP-1 dapat menekan ekspresi gen prokolagen sehingga terjadi penurunan sintesis kolagen (Yaar & Gilchrest 2007).

Superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan enzim yang menetralkan aktivitas ROS melalui perubahan anion superoksida menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan oksigen ( $O_2$ ). Radikalisme dari radikal bebas ini bisa diredam dengan antioksidan SOD yang akan mendonasikan elektronnya sehingga radikal bebas menjadi stabil. Mekanisme kerja SOD diduga memblock aktivasi reseptor dan ekspresi gen-gen AP-1 dan MMP. SOD mengaktifkan jalur sintesis kolagen melalui aktivasi ekspresi gen TGF- $\beta$  dan prokolagen (Helfrich *et al.* 2008).



**Gambar 2. Pengaruh rSOD terhadap deposisi kolagen**

### Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa rSOD dengan jumlah yang digunakan tidak mempengaruhi viabilitas sel, namun pemberian 16 U/ml rSOD meningkatkan jumlah kolagen secara bermakna.

### Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Indonesia Toray Science Foundation (ITSF, 2013) atas pendanaan penelitian ini.

### Daftar pustaka

- Helfrich Y, Sachs J, Voorhees. 2008. Overview of skin aging and photoaging, *Dermatology Nursing*, Vol. 20(3).
- Indrayati A, Asyarie S, Suciati T & Retnoningrum DS. 2014. Study on the Properties of Purified Recombinant Superoxide Dismutase from *Staphylococcus equorum*, a Local Isolate from Indonesia. *IntJ Pharm Pharm Sci*. 6(11).
- Lyons NM & Brien O. 2002. Modulatory Effects of An Algal Extract Containing Astaxanthin on UVA-Irradiated Cells in Culture. *J. Dermatol. Sci*. 30.
- Park HM & Hwang E. 2011. Royal Jelly Protects Against Ultraviolet B-Induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts Via Enhancing Collagen Production. *J.Med.Food* 1-9.
- Quan T, Qin Z, Xia, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. 2009. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 14, 20-24.
- Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. 2006. Photoaging: Mechanisms and Repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1-19.
- Sasaki H, Hirohiko A, Takeshi H. 2000. Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT, *J*

- Invest Dermatol, Vol.114(3): 502-507.
- Skowron J & Lidia Z. 2004. Cytotoxicity of resorcinol under short- and long-term exposure in vitro, International Journal of Occupational Safety and Ergonomics (JOSE), Vol. 10 (2): 147-156.
- Tiedtke AJ & Marks O. 2007. Stimulation of Collagen Production in Human Fibroblasts. Cosmet. Sci. Technol. 15-18.
- Walterova D & Vostalova J. 2006. Ultraviolet Light Induced Alteration to the Skin. Biomed Pap Med. 150, 25-38.
- Xu X, Wang Y, Steffensen B. 2004. Contributions of the MMP-2 Collagen Binding Domain to Gelatin Cleavage Substrate Binding Via the Collagen Binding Domain is Required for Hydrolysis of Gelatin but not Short Peptides. Matrix Biol. 23, 171-181.
- Yaar M & Gilchrist BA. 2007. Photoageing: Mechanism, Prevention and *Acidithiobacillus ferrooxidans* Therapy. Br. J. Dermatol. 157, 874-887.