

Pemberian tempoyak per oral dapat menghambat peningkatan ekspresi matriks metaloproteinase-1 pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur Wistar yang dipajan sinar UVB

¹Joni Fiter, ²AAG Putra Wiraguna, ³Wimpie Pangkahila

¹Program Pascasarjana Anti-Aging Medicine

²Departemen Penyakit Kulit dan Kelamin,

³Departemen Andrologi dan Seksologi

Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar

E-mail: j_fiter@yahoo.co.id

Abstract: Ultraviolet B (UVB) is a source of free radicals that accelerate aging process, especially in the skin by increasing the expression of MMP-1. Tempoyak is rich in nutraceuticals and probiotics that may provide a protective effect against skin exposure to ultraviolet rays. This study was aimed to prove that oral tempoyak could inhibit the increase of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in UVB-induced rats (*Rattus norvegicus*). This was a true experimental study with the posttest only control group design. Subjects were 36 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 2.5-3 months, weighing 180-200 g, divided into 2 groups. The control group (P0) exposed to UVB was given oral aquadest as placebo, while the treatment group (P1) exposed to UVB was given 1 g/200 g body weight of oral tempoyak. After 15 days of treatment, all rats were anesthetized and their skin tissues were taken for examination of MMP-1 expression. The analysis showed that the average of MMP-1 expression in the control group (P0) was $25.26 \pm 11.19\%$ meanwhile the average of MMP-1 expression in the treatment group (P1) was $8.67 \pm 2.51\%$. There was a significant difference between the MMP-1 expression of the two groups ($P = 0.000$). **Conclusion:** Oral tempoyak could inhibit the increase of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in UVB-induced rats (*Rattus norvegicus*).

Keywords: tempoyak, MMP-1, UVB

Abstrak: Ultraviolet B (UVB) merupakan salah satu sumber radikal bebas yang dapat mempercepat proses penuaan, khususnya penuaan kulit melalui peningkatan ekspresi MMP-1. Tempoyak yang kaya akan kandungan nutrasetikal dan probiotik dapat memberikan efek perlindungan kulit terhadap pajanan sinar ultraviolet. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian tempoyak per oral dapat menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 tikus yang dipajan sinar ultraviolet-B (UVB). Jenis penelitian ialah eksperimental murni dengan menggunakan *post test only control group design*. Subjek penelitian ialah 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*), betina, galur Wistar, berumur 2,5-3 bulan, dengan berat badan 180-200 gr yang dibagi menjadi 2 (dua) kelompok masing-masing berjumlah 18 ekor tikus. Kelompok kontrol (P0) diberikan pajanan UVB dan akuades per oral sebagai plasebo sedangkan kelompok perlakuan (P1) diberikan pajanan UVB dan tempoyak dengan dosis 1 gr/200 gr BB. Setelah 15 hari perlakuan, seluruh tikus dianestesi kemudian diambil jaringan kulitnya untuk pemeriksaan ekspresi MMP-1 dermis. Hasil analisis menunjukkan bahwa rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok kontrol (P0) ialah $25,26 \pm 11,19\%$ sedangkan rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok perlakuan (P1) ialah $8,67 \pm 2,51\%$. Terdapat perbedaan bermakna antara rerata ekspresi MMP-1 antara kedua kelompok ($P = 0,000$). **Simpulan:** Pemberian tempoyak per oral dapat menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipajan sinar ultraviolet-B (UVB).

Kata kunci: tempoyak, MMP-1, UVB

Proses penuaan menyebabkan terjadinya perubahan pada kulit antara lain penurunan kekenyalan kulit sehingga kulit menjadi berkerut, tipis, dan rapuh. Perubahan pada kulit dapat disebabkan oleh faktor internal maupun eksternal. Faktor eksternal yang berperan terutama ialah sinar matahari, salah satunya sinar UVB.¹

Sinar UV yang paling berpengaruh terhadap kerusakan kulit ialah UVB karena karakteristik panjang gelombang yang lebih pendek dan paling banyak menembus atmosfer bumi. Paparan UVB memberikan dampak terhadap peningkatan enzim matriks metaloproteinase-1 (MMP-1) yang berperan mendegradasi kolagen.² Kolagen merupakan salah satu penyusun struktur kulit sehingga degradasi kolagen mengakibatkan kulit menjadi keriput dan menua.³

Sebagai bahan makanan, tempoyak kaya akan antioksidan. Antioksidan berguna untuk meredam radikal bebas yang merupakan penyebab timbulnya penuaan kulit. Antioksidan bekerja dengan cara menekan terbentuknya ROS dan bekerja juga pada jalur *mitogen-activated phosphokinase* (MAPK) yang akan berimplikasi terhadap terjadinya hambatan peningkatan ekspresi MMP-1.⁴ Selain itu, tempoyak juga kaya akan kandungan probiotik yang memiliki properti *anti-aging* dalam menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 melalui beberapa mekanisme, yakni: sebagai antioksidan, memblokir transkripsi gen MMP-1 melalui inhibisi sinyal MAPK; dan penghambatan aktivitas TNF- α .⁵⁻⁸ Penelitian ini bertujuan untuk mengamati efek tempoyak dalam menghambat peningkatan ekspresi MMP-1.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini ialah eksperimental murni dengan menggunakan *post test only control group design*. Subjek yang digunakan ialah 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*), betina, galur Wistar, berumur 2,5-3 bulan, dengan berat badan 180-200 gr yang terbagi menjadi 2 (dua) kelompok masing-masing berjumlah 18 ekor tikus. Kelompok kontrol (P0) diberikan paparan

UVB dan akuades per oral sebagai plasebo sedangkan kelompok perlakuan (P1) diberikan paparan UVB dan tempoyak. Sebelum perlakuan, seluruh tikus diadaptasi selama beberapa hari di dalam kandang dengan diberi makan dan minum ad libitum.

Tempoyak diberikan peroral dengan dosis 1 gr/200 gr BB. Tempoyak dibuat dari daging buah durian yang dilumatkan dengan cara diblender kemudian diberi garam sebanyak 3% dan tablet Rillus yang telah dihancurkan sebagai *starter* sebanyak 3%, selanjutnya difermentasi selama 3-5 hari. Rillus merupakan tablet sinbiotik yang diproduksi oleh Kalbe dengan komposisi tiap tablet kunyah mengandung *viable cell* $1,0 \times 10^9$ CFU, terdiri dari: *Lactobacillus plantarum* 8,55 mg, *Streptococcus thermophilus* 8,55 mg, *Bifidobacterium bifidum* 2,55 mg, dan FOS 480 mg. Bahan lainnya berupa *isomalt*, *xylitol*, perisa susu, dan perisa vanila. Tujuan penggunaan tablet Rillus sebagai *starter* ialah untuk memberikan keseragaman kandungan probiotik di dalam tempoyak.

Dari uji analisis yang dilakukan di unit laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Udayana terhadap tempoyak diperoleh kadar flavonoid 4,95 mg/100 QE, fenol 44,49 mg/100 GAE, beta karoten 189,58 ug/100 gr, vitamin C 423,56 mg/100 gr dan total bakteri penghasil asam laktat sebesar $3,265 \times 10^7$ CFU/gr. Selain itu, hasil pemeriksaan mikrobiologi yang dilakukan di UPT Laboratorium Kesehatan menunjukkan bahwa tempoyak yang digunakan dalam penelitian ini mengandung total bakteri asam laktat sebesar $4,568 \times 10^7$ CFU/gr. Identifikasi fenotipik menunjukkan bahwa tempoyak ini mengandung bakteri *Lactobacillus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, dan *Pediococcus*.

Sinar UVB (TL UVB 20 watt; Phillips®) diberikan setiap 48 jam sekali dengan dosis total 80mJ/cm². Perlakuan dilakukan selama 15 hari. Setelah 24 jam sejak penyinaran terakhir, tikus di eutanasia menggunakan *xylazine* dan *ketamine* dengan dosis masing-masing 4-8 mg/kgBB

IM dan 22-44 mg/kgBB IM. Sampel biopsi kulit dibekukan di suhu -80°C . Spesimen kulit tersebut dilakukan pemeriksaan imunohistokimia jaringan untuk dihitung ekspresi MMP-1. Hasil penelitian dianalisis dan disajikan menggunakan analisis deskriptif, normalitas data, homogenitas data, dan uji komparabilitas.

HASIL DAN BAHASAN

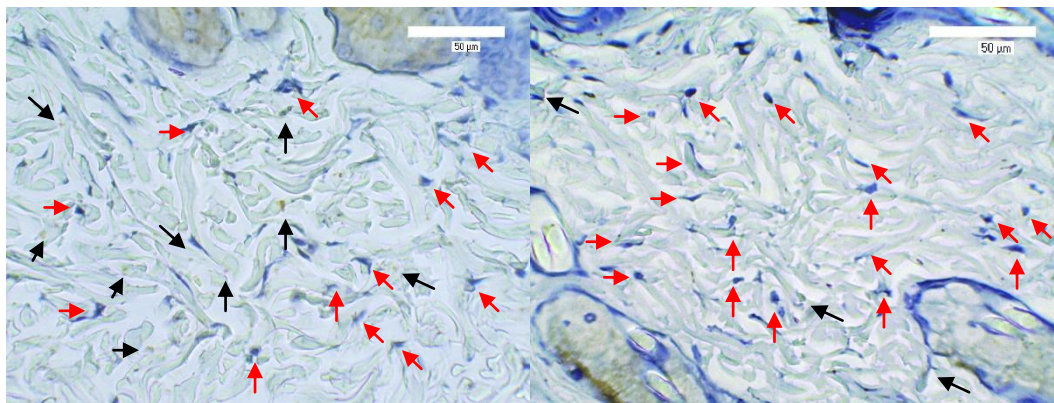
Hasil penelitian menunjukkan rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok kontrol (P0) yang diberikan pajanan UVB dan diberikan plasebo berupa akuades oral ialah $25,26 \pm 11,19\%$, sedangkan pada kelompok

perlakuan 1 (P1) yang diberikan pajanan UVB dan diberikan tempoyak per oral dengan dosis 1 gr/200gr BB tikus ialah $8,67 \pm 2,51\%$ (Tabel 1). Berdasarkan uji komparabilitas diketahui bahwa rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok P1 secara statistik lebih rendah bermakna jika dibandingkan rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok P0 ($P = 0,000$). Perbedaan ekspresi MMP-1 pada masing-masing kelompok ditunjukkan oleh fibroblas yang mengekspresikan MMP-1 dan fibroblas yang tidak mengekspresikan MMP-1 (Gambar 1).

Tabel 1. Perbandingan rerata ekspresi MMP-1 antar kelompok

Kelompok	n	Rerata \pm SB (%)	t	P
Kontrol (P0)	18	$25,26 \pm 11,19$	6,132	0,000
Perlakuan 1 (P1)	18	$8,67 \pm 2,51$		

N = Jumlah sampel; SB = Simpangan baku; $t = t$ -hitung; $P =$ signifikansi



Gambar 1. Hasil pemeriksaan imunohistokimia jaringan dermis tikus (sediaan dilihat dengan mikroskop Olympus CX41 (Japan) dan difoto dengan kamera Optilab-pro (Miconos, Indonesia) dengan perangkat lunak Optilab Viewer 1.0 dan Image Raster 2.1. Anak panah merah menunjukkan fibroblas yang mengekspresikan MMP-1 dan anak panah hitam menunjukkan fibroblas yang tidak mengekspresikan MMP-1

Pemberian tempoyak oral dapat melindungi kulit dari kerusakan oksidatif yang diinduksi pajanan ultraviolet karena tempoyak mengandung antioksidan dengan kapasitas yang cukup tinggi yaitu 107,91 mg/L GAEAC. Vitamin C yang terkandung dalam tempoyak berperan sebagai anti-

oksidan intra dan ekstrasel yang sangat penting bagi tubuh. Vitamin C memberikan banyak manfaat bagi kulit, antara lain: meningkatkan sintesis kolagen, efek fotoprotektor, aktivitas antiinflamasi yang mendukung efek fotoproteksinya, memperbaiki kulit yang telah mengalami

photodamage, menghambat MMP-1 sehingga menurunkan keriput, dan menghambat tirosinase.⁹

Tempoyak juga merupakan sumber flavonoid yang dapat mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan beberapa cara, salah satunya ialah memusnahkan radikal bebas secara langsung. Flavonoid dioksidasi oleh radikal dan menghasilkan radikal yang lebih stabil dan kurang reaktif. Flavonoid menstabilkan senyawa oksigen reaktif melalui bereaksi dengan susunan reaktif dari radikal tersebut.¹⁰ Dengan dinetralisirnya radikal bebas oleh flavonoid, maka tidak terjadi aktivasi reseptor sitokin dan *growth factor* pada permukaan keratinosit epidermis dan fibroblas di dermis. Dengan tidak teraktivasinya reseptor ini maka jalur sinyal intrasel MAP Kinase yang selanjutnya menyebabkan faktor transkripsi AP-1 menjadi tidak aktif. Hal ini berakibat pada terhentinya transkripsi MMP-1 sehingga kadarnya dalam kulit menjadi berkurang, yang ditunjukkan dengan penurunan mRNA MMP-1 dan kadar protein MMP-1.^{11,12}

Kandungan polifenol pada tempoyak dapat diberikan baik secara oral maupun topikal untuk mendapatkan efek fotoproteksi. Mekanisme antioksidan senyawa polifenol didasarkan atas kemampuannya mendonorkan atom hidrogen dan kemampuan mengkelat ion-ion logam. Setelah mendonorkan satu atom hidrogen, senyawa fenolik menjadi senyawa yang stabil dan tidak mudah mengalami resonansi, sehingga tidak mudah berpartisipasi dalam reaksi radikal yang lain.^{10,13} Dengan mengurangi reaktivitas radikal bebas, maka pemberian polifenol ini dapat mencegah sintesis dan akumulasi MMP pada kulit.

Dalam penelitian ini, penggunaan tempoyak dalam mencegah peningkatan ekspresi MMP1 pada kulit yang dipajan UVB juga disebabkan oleh kandungan probiotiknya yang dinilai turut berkontribusi dalam menghambat peningkatan ekspresi MMP-1. Probiotik memiliki properti *anti-aging* melalui berbagai

mekanisme pada kulit.

Pada penelitian dengan menggunakan tikus yang dipajan UVB, pemberian oral *Bifidobacterium breve* terbukti dapat mencegah kehilangan air transepidermal dibandingkan dengan tikus yang menerima plasebo. Pemberian *B. breve* pada tikus yang dipajan UVB dapat menurunkan kadar hidrogen peroksida, tingkat oksidasi protein, dan aktivitas xantin oksidase di kulit.⁵ Temuan ini menunjukkan bahwa pemberian oral probiotik turut berpartisipasi dalam meringankan tingkat stres oksidatif pada kulit yang diinduksi oleh paparan UVB.

Pada penelitian *in vitro*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NTU 101 (101EP) dan *Lactobacillus plantarum* NTU 102 (102EP) menunjukkan aktivitas yang aktif dalam memproduksi polisakarida ekstrasel (EPSs),⁷ yaitu polimer berat molekul tinggi yang terdiri dari empat monosakarida. Polisakarida ekstrasel ini memperlihatkan efek antioksidan yang nyata dan aktivitas penangkapan radikal bebas.^{14,15} Pada penelitian oleh Bruno-Barcena et al.¹⁶ yang menambahkan *heterologous superoxide dismutase* pada *lactobacillus*, didapatkan bahwa *lactobacillus* tersebut dapat memproduksi enzim antioksidan tersebut untuk melawan radikal bebas. Studi tersebut menunjukkan bahwa dengan modifikasi genetik terhadap probiotik dapat menghambat penuaan dan mengembalikan keseimbangan radikal bebas.

Pemberian per oral *Lactobacillus plantarum* HY7714 dapat menghambat jumlah, kedalaman dan area kerutan secara signifikan pada tikus yang dipajan sinar UV.⁶ Hasil lain dari penelitian ini ialah probiotik dapat menghambat penurunan prokolagen dan menghambat ekspresi MMP-1 pada kultur fibroblas. *Lactobacillus plantarum* HY7714 juga efektif dalam menghambat ekspresi MMP-13, MMP-2, dan MMP-9 pada jaringan dermis. Pada penelitian oleh You et al.⁸ dilaporkan bahwa *lipoteichoic acid* (LTA) yang dimurnikan dari *Lactobacillus sakei* dapat menghambat MMP-1 pada kultur

fibroblas manusia (NHDFs) melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

Lipoteichoic acid (LTA) secara bermakna memblokir transkripsi gen MMP-1 dan mengurangi jumlah MMP-1 yang diproduksi oleh fibroblas melalui inhibisi sinyal MAPK, seperti p38, JNK, dan sinyal NF- κ B. Data menunjukkan bahwa penurunan produksi MMP-1 disebabkan oleh inhibisi protein p38 dan JNK yang menyebabkan penghambatan faktor transkripsi MMP-1 yaitu AP-1, dan memblokir NF- κ B menekan tingkat MMP-1 dan bFGF. Hal ini menghasilkan efek *anti-photoaging* dan meningkatkan jumlah kolagen. Selain itu, LTA menghambat MMP-1, yang diinduksi oleh TNF- α pada kultur fibroblas manusia.⁸

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian tempoyak per oral dapat menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 pada kulit tikus betina dewasa galur Wistar yang dipajan sinar UVB.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja molekuler tempoyak oral dalam menurunkan kadar MMP-1 pada kulit akibat pajanan UVB, baik dari segi farmakokinetik yang menjelaskan mekanisme perjalanan tempoyak dari sistem pencernaan hingga ke kulit, maupun segi farmakodinamik untuk menjelaskan mekanisme kerja senyawa aktif pada tempoyak dalam menurunkan kadar MMP-1 pada sel fibroblas.

Perlu dilakukan uji klinik pada manusia yang memiliki variasi metabolisme yang sangat tinggi sesuai dengan jenis kelamin, usia, dan latar belakang penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Yaar M, Gilchrist BA.** Clinical and histological features of intrinsic versus extrinsic skin aging. *Skin Aging*. Berlin: Springer, 2007; p. 9-21.

2. **Hourigan R.** Cellular energy metabolism and oxidative stress. *Textbook of aging skin*. Berlin: Springer, 2010; p. 313-20.
3. **Yarosh DB.** DNA damage and repair in skin aging. *Textbook of Aging Skin*. Berlin: Springer, 2010; p. 323-32.
4. **Chiang HM, Chen HC, Lin TJ, Shih IC, Wen KC.** *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;50(2):4260-9.
5. **Ishii Y, Sugimoto S, Izawa N, Sone T, Chimba K, Miyazaki K.** Oral administration of *Bifidobacterium breve* attenuates UV-induced barrier perturbation and oxidative stress in hairless mice skin. *Arch Dermatol Res*. 2014;305:467-73.
6. **Kim HM, Lee DE, Park SD, Kim YT, Kim YJ, Jeong JW, et al.** Oral administration of *Lactobacillus plantarum* HY7714 protects hairless mouse against Ultraviolet B-induced photoaging. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(11):1583-91.
7. **Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM.** Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides*. *J Sci Food Agric*. 2011;91(12):2284-91.
8. **You GA, Jung BJ, Kim HR, Kim HG, Kim TR, Chung DK.** *Lactobacillus sakei* lipoteichoic acid inhibits MMP-1 induced by UVA in normal dermal fibroblast of human. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23(10):1357-64.
9. **Korać RR, Khambholja KM.** Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5(10):164-73.
10. **Muchtadi TR, Sugiyono.** Prinsip Proses dan Teknologi Pangan. Bandung: Alfabeta, 2013.
11. **Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ.** Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*. 2008;20(3):177-83.
12. **Ichihashi M, Ando H, Yoshida M, Niki Y, Matsui M.** Photoaging of the skin. *J Anti-Aging Med*. 2009;6(6):46-59.
13. **Chiu AE, Chan JL, Kern DG, Kohler S, Rehmus WE, Kimball AB.** Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic

- appearance of photoaging skin. *Dermatol Surg.* 2005;31:855-9.
14. **Kishk Y, Al-Sayed HMA.** Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT-Food Science and Technology.* 2007;40(2):270-7.
15. **Kodali VP, Sen R.** Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnol J.* 2008;3(2):245-51.
16. **Bruno-Ba'rcena JM, Andrus JM, Libby SL, Klaenhammer TR, Hassan HM.** Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal Lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4702-10.