

Potential of the superoxide dismutase enzyme from corn kernels (*Zea mays* L.) for the repair of 3T3 fibroblast cells exposed to ultraviolet A light

Potensi enzim superoksida dismutase dari biji Jagung (*Zea mays* L.) untuk perbaikan sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar ultraviolet A

Mustika Endah Pratiwi¹, Jason Merari Peranginangin¹, Isna Jati Asiya², Ana Indrayati^{1*}

¹Program Studi S2 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Jebres, Surakarta-57127

²Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Jebres, Surakarta-57127

*Corresponding author: anaindrayati2020@gmail.com

Abstract

Background: UV-A radiation induct disorder to the skin called photoaging. It requires treatment with antioxidant agent. Superoxide dismutase (SOD) is the first line antioxidant in the treatment of free radicals.

Objective: This study aimed to find out anti-photoaging activities of SOD extract of corn (*Zea mays* L.) kernels on radiated UV-A rays 3T3 fibroblast cells.

Method: SOD extraction of corn kernels was done by centrifugation, precipitation, and dialysis method. The activity of SOD extract in corn kernels was measured by WST-1 method. Anti-photoaging activity test of SOD extract in corn kernels was done on radiated UV-A rays 3T3 fibroblast cells with parameters of cell viability. Anti-photoaging activity test using cell control, negative, sample, and positive control.

Results: SOD activity showed that the highest percent inhibition value was SOD extract of corn kernels in precipitation of ammonium sulphate concentration was 60-90% with inhibition percentage was 65.50%. The result of anti-photoaging activity SOD extract of corn kernels showed significant difference in the value of percent cell viability in fibroblast cells between the extract group and the negative control group with the highest percent cell viability in SOD extract corn kernels with the concentration was 100 mg/mL, namely 142.31%.

Conclusion: SOD extract from corn kernels has proven had antioxidant activity that could be used as anti-photoaging through fibroblast cell reparation mechanism.

Keywords: Corn kernel, anti-photoaging, SOD, 3T3 fibroblast cell

Intisari

Latar belakang: Radiasi sinar UV-A memicu gangguan pada kulit yang disebut *photoaging*. Gangguan tersebut ditangani dengan zat antioksidan. *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan antioksidan enzimatis lini pertama dalam penanganan radikal bebas.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung pada sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar UV-A.

Metode: Ekstraksi SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode sentrifugasi, presipitasi dan dialisis. Aktivitas SOD hasil ekstraksi biji jagung dilakukan dengan menggunakan metode WST-1. Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung dilakukan terhadap sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar UV-A. Parameter yang diamati adalah viabilitas sel. Pengujian menggunakan kontrol sel, kontrol negatif, sampel dan kontrol positif.

Hasil: Ekstrak SOD biji jagung presipitasi amonium sulfat (konsentrasi 60-90%) menunjukkan aktivitas SOD tertinggi dengan persen inhibisi 65,50%. Pengujian aktivitas *anti-photoaging* menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok ekstrak dengan kelompok kontrol negatif dengan hasil persen viabilitas sel tertinggi yaitu 142,31% pada ekstrak SOD biji jagung (consenters 100 mg/mL).

Kesimpulan: Ekstrak SOD dari biji jagung terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang dapat digunakan sebagai *anti-photoaging* melalui mekanisme perbaikan sel fibroblas.

Kata kunci: Biji jagung, *anti-photoaging*, SOD, viabilitas, sel fibroblas 3T3

1. Pendahuluan

Kulit yang terkena paparan sinar UV (ultraviolet) dari matahari secara terus-menerus akan mengalami perubahan struktur dan komposisi serta menyebabkan timbulnya *stress* oksidatif pada kulit. Perubahan yang terlihat berupa perubahan jangka pendek dan perubahan jangka panjang. Perubahan jangka pendek bersifat akut seperti pigmentasi, eritema dan fotosensitivitas, sedangkan perubahan jangka panjang berupa penuaan dini bahkan kanker kulit (Pratiwi & Husni, 2017).

Sinar UV terbagi menjadi 3, yaitu sinar UV-A (315-400 nm), UV-B (290-320 nm) dan UV-C (100-280 nm) (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014). Sinar UV-A dapat menembus hingga ke dalam ruangan dan menyerang lapisan dermis kulit. Hal ini dianggap sebagai penyebab utama penuaan kulit. Lapisan dermis meliputi 80-90% bagian dari kulit. Lapisan ini terdiri dari kolagen (70%), elastin dan matriks ekstraseluler yang berasal dari sel fibroblas. Lapisan dermis berkontribusi pada ketebalan kulit, terlibat dalam pembentukan kerutan, berperan dalam metabolisme, penyembuhan luka dan perbaikan sel. Fibroblas secara langsung berkaitan dengan penuaan karena memiliki reseptor untuk faktor pertumbuhan epidermal dan faktor pertumbuhan fibroblas (Yong & Ahn, 2018).

Perubahan yang terjadi pada kulit bila terpapar sinar matahari terus-menerus dalam waktu lama (kronik) dan intensitas sinar matahari kuat (radiasi UV tinggi) disebut *dermatoheliosis* atau *photoaging*. Kelainan kulit ini termasuk dalam penuaan ekstrinsik (penuaan karena faktor luar). Radiasi sinar UV menimbulkan radikal bebas pada kulit. Radikal bebas ini menghalangi difusi zat nutrisi, menon-aktifkan enzim, mengoksidasi lemak (dalam sel, membran sel dan antar sel) dan memecah DNA sehingga dapat membantu timbulnya keadaan pra-kanker (Kartawiguna, 2011).

Penanganan *aging* dilakukan dengan bahan kimia seperti *alpha hydroxy acid*, *retinoid*, *fluorouracil cream*. Selain itu, dapat juga dilakukan dengan *facial rejuvenation*, seperti *botox*, implantasi, *blepharoplasty* dan masih banyak lagi (Damayanti & Ratnayanti, 2013). Selain penggunaan bahan kimia dan *treatment* perawatan wajah, penanganan *aging* juga sedang dikembangkan melalui pemanfaatan bahan alam yang memiliki senyawa yang berpotensi sebagai *anti-aging*. Beberapa penelitian terkait penanganan *photoaging* menggunakan bahan alam telah dilakukan, diantaranya efek *anti-photoaging* dari ekstrak jeju putgyul (*Unripe citrus*) (Choi *et al.*, 2017), ekstrak *Bouea macrophylla* (Cheong *et al.*, 2018), ekstrak propolis (Ebadi & Fazeli, 2017) dan ekstrak *Angelica acutiloba* (Park *et al.*, 2017).

Radikal bebas dapat dinetralkan oleh antioksidan yang terdapat dalam tubuh yaitu enzim CAT (katalase), GSH-Px (glutation peroksidase), SOD (superoksida dismutase) dan zat non enzim yaitu vitamin E, vitamin C, beta karoten, vitamin A, metionin, selenium dan tirosin (Kartawiguna, 2011). SOD merupakan antioksidan enzimatik sangat kuat yang mengkatalisis perubahan radikal O_2^* (anion superoksida) menjadi H_2O_2 (hidrogen peroksida) dan O_2 (molekul oksigen) dalam sirkulasi peredaran darah. Antioksidan ini bekerja mengeluarkan substansi berbahaya seperti radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif yang berkontribusi dalam penuaan. Untuk itu, diperlukan enzim SOD dari suplemen makanan untuk mengatasi *photoaging* yang disebabkan oleh radikal bebas (Sharma *et al.*, 2014).

Penelitian tentang isolasi SOD dari tumbuhan tingkat tinggi telah dilakukan oleh beberapa peneliti, di antaranya isolasi SOD dari biji bayam (*Amaranthus spinosus*) dengan aktivitas spesifik SOD sebesar 0,54 unit/mg (Sharma *et al.*, 2014) dan isolasi SOD dari akar *Stemona tuberosa* dengan aktivitas spesifik SOD sebesar 27,8 unit/mg (Niyomploy *et al.*, 2014). Namun, belum ada penelitian lanjutan mengenai aktivitas farmakologi *anti-photoaging* baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dari tumbuhan-tumbuhan yang telah diisolasi enzim SOD-nya.

Jagung mengandung senyawa yang dapat beraktivitas sebagai antioksidan, yaitu senyawa beta karoten dan SOD. Isolasi SOD dari biji jagung telah dilakukan oleh Baum *et al.* (1983), namun belum dilakukan penelitian lanjutan terkait SOD dari biji jagung. SOD yang terdapat pada biji jagung berpotensi sebagai antioksidan yang dapat digunakan untuk menangani *photoaging*. Berdasarkan alasan tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan ekstraksi SOD dari biji jagung, menguji aktivitas antioksidan SOD menggunakan metode WST-1 (*Water soluble tetrazolium-1*) dan melakukan uji aktivitas *anti-photoaging* menggunakan sel fibroblas 3T3 dengan parameter viabilitas sel.

2. Metode

2.1. Bahan dan sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jagung, akuabides, NaOCl (natrium hipoklorit), dapar kalium fosfat 0,05 mM pH 7, amonium sulfat, tabung selofan, superoxide dismutase *activity assay kit*, sel fibroblas 3T3, media padat, $NaHCO_3$ (sodium bikarbonat), HCl 1 N, NaOH 1 N, penisilin-streptomisin, FBS (*Fetal Bovine Serum*), media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X, reagen MTT, SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10%, HCl pekat, *sirius red*, asam pikrat, HCl 0,1 N, NaOH 0,5 N, tisu, alumunium *foil*. Sampel berupa buah jagung utuh dibeli di pasar tradisional Kaliurang kota Yogyakarta

2.2 Jalannya penelitian

2.2.1 Ekstraksi enzim SOD biji jagung

Biji jagung sebanyak 2000 g disterilkan selama 10 menit dalam 1% NaOCl, kemudian dibilas menggunakan akuabides dan direndam dalam akuabides selama 24 jam. Selanjutnya, biji jagung ditiriskan dan dihomogenisasi menggunakan *blender* dengan penambahan dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 500 mL. Homogenat tersebut disaring dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C kemudian diambil supernatannya.

Amonium sulfat ditambahkan ke dalam supernatan untuk membuat presipitasi amonium sulfat konsentrasi 20% kemudian diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan yang diperoleh dibuat dalam konsentrasi presipitasi 40% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan ini kemudian dibuat dalam konsentrasi presipitasi 60% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan yang diperoleh dibuat dalam konsentrasi presipitasi 90% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya.

Pelet dari masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat diresuspensikan ke dalam dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 20 mL dan didialisis selama 24 jam dalam dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0. Dialisat dari masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil peletnya. Pelet masing-masing ekstrak SOD presipitasi amonium sulfat dari biji jagung diresuspensi dengan dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 20 mL dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C

2.2.2 Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung

- 1) Penyiapan *WST Working Solution*. Sebanyak 1 mL larutan WST diencerkan dengan 19 mL larutan dapar *assay*. Larutan ini stabil sampai 2 bulan penyimpanan pada suhu 4 °C.
- 2) Penyiapan *Enzyme Working Solution*. Larutan enzim disentrifugasi selama 5 detik. Larutan dicampur secara sempurna dengan menggunakan pipet (tahap ini perlu dilakukan karena enzim mempunyai dua lapis dan harus bercampur dengan sempurna sebelum dilakukan pengenceran).

Larutan enzim sebanyak 15 µL diencerkan dengan 2,5 mL larutan dapar. Hasil pengenceran larutan enzim stabil sampai 3 minggu pada suhu 4 °C.

- 3) Penyiapan Sampel Uji. Ekstrak SOD biji jagung pada masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat dilarutkan dalam dapar kalium fosfat sebanyak 20 µL. Larutan sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3 dibuat dengan komposisi seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi larutan sampel dan blanko

	Sampel (µl)	Blanko 1 (µl)	Blanko 2 (µl)	Blanko 3 (µl)
Larutan sampel	20	-	20	-
ddH ₂ O	-	20	-	20
WST Working Solution	200	200	200	200
Enzyme Working Solution	20	20	-	-
Larutan dapar	-	-	20	20

Larutan sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3 dimasukkan dalam *plate 96 well* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Larutan uji diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Hasil absorbansi digunakan untuk menentukan persen inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = [(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 2}})] / (A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) \times 100$$

Keterangan:

A_{blanko1} : Absorbansi blanko 1; A_{blanko 2} : Absorbansi blanko 2

A_{blanko3} : Absorbansi blanko 3; A_{sampel}: Absorbansi sampel

2.2.3 Pengujian aktivitas anti-photoaging secara in vitro

- 1) Pembuatan media cair

Media padat DMEM disiapkan sebanyak 1 sachet. Akuabides steril sebanyak 800 mL disiapkan dalam gelas beker 1000 mL dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Media bubuk DMEM dituang ke dalam akuabides steril dalam gelas beker, kemudian diaduk hingga homogen. Sisa bubuk dalam kemasan media dibersihkan dengan akuabides lalu dituang ke dalam gelas beker. Sebanyak 3,7 g NaHCO₃ ditambahkan ke dalam larutan media. Akuabides steril ditambahkan ke dalam gelas beker berisi larutan media hingga volume 1000 mL. Semua komponen dalam larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga terlarut sempurna. pH larutan media disesuaikan dengan penambahan HCl 1N atau NaOH 1N. Media yang telah disesuaikan pH-nya difiltrasi menggunakan filter 0,2 µm kemudian media ditampung ke dalam botol Duran 1000 mL. Larutan media diberi penanda dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C.

- 2) Pembuatan media kultur

FBS dan penisilin-streptomisin dicairkan terlebih dahulu pada suhu ruang sebelum digunakan. Botol Duran volume 100 mL disiapkan. Sebanyak 10 mL FBS diambil dan dituang ke dalam botol Duran. Sebanyak 1 mL penisilin-streptomisin diambil dan dituang ke dalam botol

Duran. Media cair ditambahkan ke dalam botol Duran hingga volume 100 mL. Botol diberi penanda berupa nama media dan tanggal pembuatan media kultur.

3) Penyiapan Sel Fibroblas 3T3

Cryo tube yang berisi sel diambil dari tangki nitrogen cair. Suspensi sel dalam *cryo tube* dicairkan pada suhu ruang hingga mencair sempurna. Suspensi sel diambil menggunakan *micropipet* 1000 μ l kemudian dimasukkan setetes demi setetes ke dalam *conical tube* berisi media kultur yang telah disiapkan. *Conical tube* ditutup rapat kemudian suspensi sel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. *Conical tube* disemprot dengan alkohol untuk kondisi kerja aseptis. *Conical tube* dibuka dan supernatan media kultur dibuang ke dalam pembuangan. Sebanyak 4 mL media kultur ditambahkan ke dalam *conical tube* lalu sel diresuspensi hingga homogen. Sebanyak 2 mL suspensi sel dipindahkan ke dalam *petridish* kemudian ditambahkan media kultur sebanyak 5 mL. Kondisi sel dalam *petridish* diamati dengan mikroskop. Sel disimpan dalam inkubator CO₂ 5%.

Sel diambil dari inkubator CO₂ dan diamati kondisinya, serta dipanen setelah mencapai konfluensitas 80%. Media dibuang menggunakan *micropipet* atau pipet *pasteur* steril. Sel dicuci dengan PBS sebelum dipanen. Sel dipanen dengan cara menambahkan tripsin 0,1 % dan EDTA. Sel yang telah dipanen kemudian diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan media kultur. Sel disentrifugasi, kemudian diambil bagian peletnya. Sel ditambahkan lagi dengan media kultur, kemudian dilakukan perhitungan sel menggunakan alat hemositometer.

4) Pemaparan Sel Fibroblas 3T3 dengan Sinar UV-A

Media dari kultur sel yang telah konfluen dibuang kemudian sel dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS 1X. Sel disinari dengan lampu UV-A pada dosis 1000 mJ/cm² selama 55 menit pada jarak sinar 1 meter. Kelompok kontrol sel normal dan blanko ditutup menggunakan isolasi hitam agar tidak terkena sinar UV-A. Setelah penyinaran, PBS dibuang kemudian diganti dengan media kultur sebanyak 100 μ L. *Microplate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama 24 jam.

5) Pembuatan Larutan Stok Ekstrak SOD Biji Jagung

Larutan ekstrak SOD biji jagung dibuat pada konsentrasi 12,5; 25; 50; dan 100 mg/mL dengan metode pengenceran bertingkat.

6) Penentuan Viabilitas Sel

Viabilitas sel ditentukan menggunakan uji MTT. Sel yang telah dipaparkan sinar UV-A, diberi larutan uji dan diinkubasi selama 24 jam. Larutan dalam *plate* dibuang setelah diinkubasi. Setiap kelompok sampel ditambahkan larutan MTT sebanyak 100 μ L. Larutan MTT dibuat sebanyak 10

mL dengan perbandingan MTT : media (1:9). *Plate* berisi MTT kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator CO₂. *Plate* berisi MTT ditambahkan *stopper* SDS 10% sebanyak 100 µL tiap *well* dan disimpan selama 24 jam dengan membungkus *plate* terlebih dahulu dengan *aluminium foil* atau kertas. Jumlah formazan dihasilkan dari reduksi MTT oleh mitokondria sel hidup ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus untuk menentukan persen viabilitas sel. Rumus persen viabilitas sel:

$$\frac{(\text{Abs.sel perlakuan} - \text{Abs.blanko})}{(\text{Abs.sel kontrol} - \text{Abs.blanko})} \times 100\%$$

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Ekstraksi enzim SOD biji jagung

Ekstraksi SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode sentrifugasi, dilanjutkan dengan presipitasi enzim menggunakan amonium sulfat dan tahap akhir dilakukan dialisis. Ekstrak SOD biji jagung yang diperoleh berupa padatan berwarna putih kekuningan. Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi SOD biji jagung pada tahap presipitasi amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen ekstrak SOD biji jagung

No.	Konsentrasi presipitasi amonium sulfat (%)	Berat basah (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1.	0-20	2.000	4,56	0,228
2.	20-40	2.000	4,78	0,239
3.	40-60	2.000	5,20	0,260
4.	60-90	2.000	5,69	0,285

Metode pengambilan enzim dimulai dari pemecahan sel yang dilakukan dengan cara homogenisasi sampel biji jagung menggunakan alat *blender*. Dapar kalium fosfat ditambahkan pada sampel biji jagung untuk membantu membasahi sel agar proses pemecahan sel menjadi lebih mudah. Penambahan dapar kalium fosfat juga dimaksudkan untuk mempertahankan pH enzim yang akan diambil. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan fraksi yang larut (*supernatan*) dan tidak larut (*debris*), dimana protein terdapat dalam fraksi terlarut. Hal ini dikarenakan sel memiliki densitas yang lebih besar daripada molekul protein. *Supernatan* yang diperoleh disebut dengan ekstrak kasar SOD biji jagung. Langkah selanjutnya yaitu pemurnian SOD menggunakan metode pengendapan dan filtrasi. *Supernatan* yang diperoleh ditambahkan padatan amonium sulfat. Penambahan amonium sulfat disesuaikan dengan konsentrasi kejenuhan presipitasi yang diinginkan.

Konsentrasi garam yang ditambahkan ke dalam ekstrak kasar SOD biji jagung dibuat variatif dan dilakukan pada suhu rendah. Kondisi suhu rendah mampu meningkatkan presipitasi protein saat penambahan garam dengan kadar tinggi. Semakin tinggi konsentrasi garam, kelarutan protein akan

semakin rendah sehingga protein akan mengendap. Garam memiliki derajat ionisasi yang lebih tinggi daripada protein, sehingga garam memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap air yang mengelilingi protein. Akibatnya, terjadi kompetisi antara garam dan protein untuk mempertahankan molekul air. Keuntungan menggunakan metode pengendapan dengan amonium sulfat yaitu dapat mengendapkan hampir seluruh protein karena amonium sulfat memiliki molaritas yang besar, memiliki densitas rendah yakni $1,235 \text{ g/cm}^3$ sehingga amonium sulfat tidak akan ikut terendapkan saat sentrifugasi protein.

Pemurnian tahap lanjut dilakukan dengan filtrasi menggunakan kantong dialisis. Metode dialisis merupakan metode yang umumnya digunakan untuk meningkatkan kemurnian suatu molekul dalam tahap purifikasi. Pemisahan ini perlu dilakukan untuk mengeluarkan sisa garam amonium sulfat yang kemungkinan ikut terendapkan bersama protein, agar garam amonium sulfat tersebut tidak mengganggu tahap pengujian selanjutnya.

3.2 Aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung

Aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode WST-1. Nilai absorbansi ekstrak SOD biji jagung yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus bersama dengan nilai absorbansi blanko 1, 2 dan 3 untuk memperoleh nilai persen inhibisi. Persen inhibisi aktivitas SOD ekstrak biji jagung dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persen inhibisi pengukuran aktivitas ekstrak SOD biji jagung

No.	Sampel (%)	% Inhibisi (1)	% Inhibisi (2)	% Inhibisi (3)	Rerata \pm SD
1.	Presipitasi amonium sulfat 0-20	45,61	42,11	52,63	46,78 \pm 5,36
2.	Presipitasi amonium sulfat 20-40	52,63	49,12	56,14	52,63 \pm 3,51
3.	Presipitasi amonium sulfat 40-60	61,40	56,14	63,16	60,23 \pm 3,65
4.	Presipitasi amonium sulfat 60-90	63,16	61,40	71,93	65,50 \pm 5,64

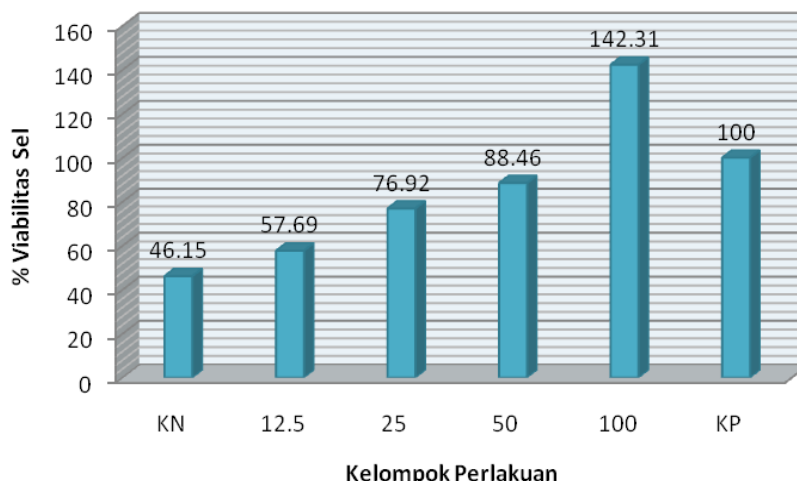
WST memiliki rumus kimia 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt yang menghasilkan pewarna formazan yang larut dalam air pada reduksi dengan O_2^* . Nilai reduksi WST-1 dari O_2^* berhubungan linier dengan aktivitas xantin oksidase dan aktivitas tersebut dihambat oleh SOD. Aktivitas hambat dari SOD dapat ditentukan dengan metode kolorimetri. Prinsip dari pengukuran SOD adalah radikal bebas atau superoksida yang dihasilkan akan bereaksi dengan WST-1 sehingga menghasilkan WST-1 formazan yang berwarna kuning. SOD mengubah superoksida yang akan menghambat reduksi WST-1 menjadi WST-1 formazan. SOD berkompetisi dengan WST-1 untuk bereaksi dengan superoksida sehingga menghambat pembentukan zat warna. Aktivitas SOD diukur melalui derajat penghambatan (inhibisi)

pembentukan zat warna pada panjang gelombang 450 nm (Wahyu *et al.*, 2005). Panjang gelombang 450 nm merupakan panjang gelombang yang dapat menganalisis serapan warna yang dihasilkan dari reaksi WST-1 menjadi WST-1 formazan (Baharvand, 2015).

Persen inhibisi paling tinggi dari ekstrak SOD biji jagung ditunjukkan pada presipitasi enzim amonium sulfat konsentrasi 60-90% yaitu sebesar 65,50 %. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi presipitasi amonium sulfat, maka semakin murni enzim yang diperoleh sehingga aktivitas antioksidannya juga semakin meningkat. Ekstrak SOD biji jagung presipitasi amonium sulfat konsentrasi 60-90% digunakan untuk pengujian aktivitas *anti-photoaging*.

3.3 Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung

Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak enzim biji jagung ditentukan berdasarkan parameter persen viabilitas sel. Persen viabilitas sel fibroblas 3T3 setelah dipaparkan sinar UV-A setelah pemberian ekstrak SOD biji jagung dan asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Persen viabilitas sel fibroblas 3T3

Keterangan:

KN : Kontrol negatif (sel yang diberikan dapar kalium fosfat)

KP : Kontrol positif (sel yang diberikan asam askorbat 1,25 mg/mL)

Sinar UV-A yang dipaparkan pada sel menurunkan viabilitas sel fibroblas 3T3 dilihat dari persen viabilitas sel pada kelompok kontrol negatif jika dibandingkan dengan persen viabilitas sel yang tidak dipaparkan sinar UV-A. Pemberian ekstrak SOD biji jagung menunjukkan peningkatan persen viabilitas sel jika dibandingkan dengan persen viabilitas sel pada kelompok kontrol negatif. Peningkatan persen viabilitas sel yang paling tinggi ditunjukkan oleh penambahan ekstrak SOD biji jagung konsentrasi 100 mg/mL dengan nilai 142,31 %. Hasil ini dihitung menggunakan kontrol berupa pemberian asam askorbat konsentrasi 1,25 mg/mL. Hasil yang diperoleh dalam penelitian

ini menunjukkan persen viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan persen viabilitas sel yang dihasilkan dari pemberian kombinasi madu dan ekstrak lidah buaya yang menghasilkan viabilitas sel sebesar 99,80% (Rizqi & Amestiasih, 2020). Asam askorbat dan SOD merupakan zat antioksidan, akan tetapi memiliki mekanisme yang berbeda dalam mengatasi radikal bebas. Persen viabilitas sel yang diberikan asam askorbat lebih tinggi dibandingkan ekstrak SOD biji jagung karena asam askorbat yang digunakan merupakan asam askorbat murni, sedangkan ekstrak SOD biji jagung memiliki kemurnian yang masih rendah, sehingga efek yang dihasilkan lebih rendah di bawah asam askorbat sebagai kontrol positif.

Penuaan akibat paparan sinar UV (*photoaging*) melibatkan berbagai mekanisme, seperti kolagenase dan aktivitas sitokin inflamasi. Sitokin inflamasi ini merangsang akumulasi senyawa oksigen reaktif (SOR) yang merusak jaringan dan sel kulit. Radikal bebas yang terbentuk akibat paparan sinar UV khususnya sinar UV-A yang kronis dapat diatasi dengan senyawa antioksidan. SOD sebagai antioksidan enzimatis lini awal dapat mereduksi radikal bebas dengan cara mengubah radikal bebas reaktif menjadi radikal bebas yang tidak reaktif. SOD akan mengubah O_2^- menjadi H_2O_2 sehingga radikal bebas yang terbentuk dapat berkurang.



Gambar 2. Sel fibroblas sebelum dipaparkan sinar UV-A

Sel fibroblas normal digambarkan dalam bentuk *spindle* memanjang dengan ujung yang hampir tidak jelas. Sel fibroblas yang viabilitasnya tidak menurun akibat paparan sinar UV menunjukkan bentuk sel fibroblas normal. Hal ini terjadi karena kerusakan pada organel sel belum terjadi sehingga bentuk sel tidak mengalami perubahan. Gambar sel fibroblas normal yang tidak dipaparkan sinar UV-A dapat dilihat pada Gambar 2. Sel fibroblas manusia bereplikasi dengan jumlah terbatas sebelum memasuki tahap terhentinya pembelahan secara permanen, yang disebut sebagai penuaan replikatif (*replicative senescence*) atau penuaan sel (*cellular senescence*). Selain penuaan replikatif, sel juga dapat diinduksi untuk mengalami penuaan dini dengan paparan dosis sub

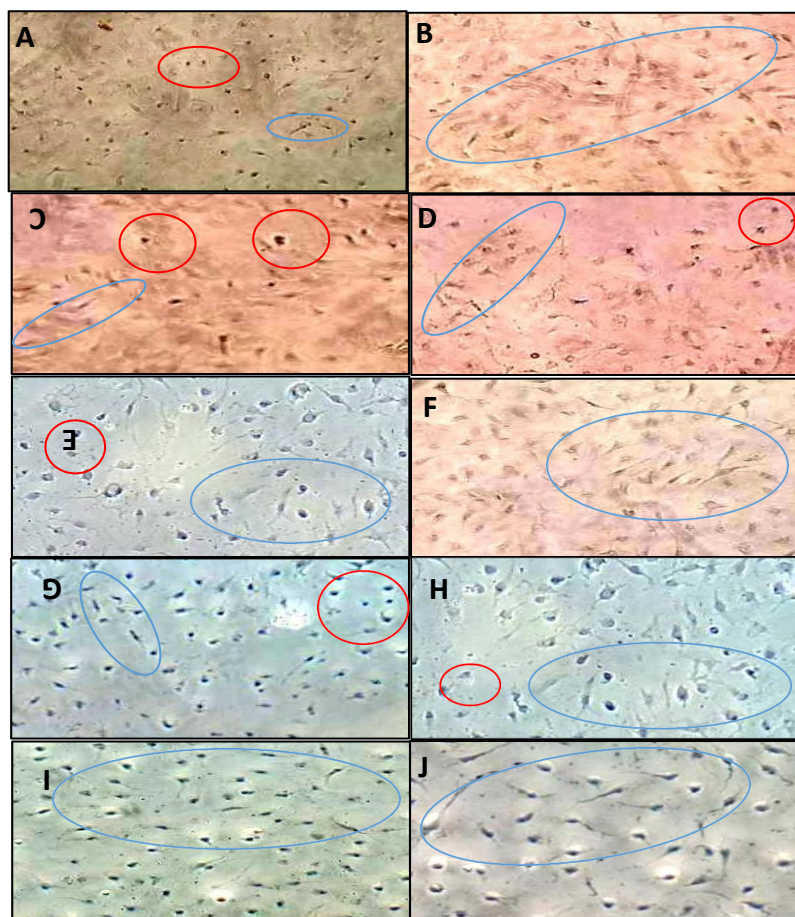
sitotoksik agen penyebab stres oksidatif, agen perusak DNA, *histone deacetylase inhibitor*, atau over ekspresi onkogen tertentu (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012).

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan fungsi metabolismenya (Indrayati *et al.*, 2016). Metabolisme sel berhubungan dengan keadaan organel-organel sel yang berperan dalam prosesnya. Apabila organel sel dalam keadaan baik, maka sel dapat bermetabolisme dengan baik sehingga viabilitas sel tidak mengalami penurunan. Paparan sinar UV secara berlebihan dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas SOR, yaitu radikal O_2^* . Radikal O_2^* akan merusak mitokondria sel, sehingga siklus sel akan berhenti dan menyebabkan viabilitas sel menurun. Viabilitas sel yang menurun ini akan berpengaruh pada jumlah sintesis kolagen dan elastin yang berperan penting dalam kesehatan kulit.

Radikal superoksida yang terbentuk akan menginduksi kerusakan DNA melalui *cross linking* yang terjadi antara basa pirimidin yang berdekatan. *Cross linking* ini akan menyebabkan kerusakan langsung pada DNA karena terjadinya pembentukan *cyclobutane-pirimidin dimer (CDPs)* dan *pirimidin-pyrimidone (6-4) photoproducts ((6-4)PP)* dan ikatan dengan asam amino aromatik. Hal ini mengakibatkan provokasi radikal bebas dan penurunan antioksidan kulit, merusak kemampuan kulit untuk melindungi diri dari radikal bebas yang dihasilkan oleh paparan sinar matahari (Svobodova *et al.*, 2006). Kerusakan DNA ini dapat menghambat proliferasi sel melalui perpanjangan fase *G1-arrest* sehingga viabilitas sel akan menurun.

Sinar UV juga menimbulkan kerusakan pada kulit secara tidak langsung, melalui fotosensitisasi. Efek biologis timbul apabila molekul pada kulit yang disebut kromosfor harus menyerap UV dan energi yang terserap harus diubah menjadi reaksi kimia. Kromosfor utama kulit yaitu DNA, asam urokonik, asam amino aromatik, retinoid, karotenoid, bilirubin, flavin, hemoglobin, melanin dan NAD(P)H (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Penyerapan energi UV pada fotoreaksi tipe-1 akan menyebabkan kromosfor mentransfer elektron atau ion hidrogen ke molekul substrat membentuk radikal bebas. Pada fotoreaksi tipe-2 minor terjadi fotosensitisasi yang menghasilkan anion superoksida (O_2^*). Pada fotoreaksi tipe-2 mayor, fotosensitisasi menghasilkan *single oxygen* (1O_2). Radikal bebas yang terbentuk akan berinteraksi dengan biomolekul seluler lainnya memprovokasi respon biologis akhir (Baran & K, 2010).

SOD pada ekstrak SOD biji jagung berperan melalui pengubahan radikal O_2^* menjadi H_2O_2 yang tidak mampu menyebabkan kerusakan dengan sendirinya. H_2O_2 selanjutnya akan diubah menjadi molekul air dan oksigen oleh katalase dan glutathion peroksidase, sehingga jumlah radikal bebas dalam tubuh akan berkurang.



Gambar 3. Sel fibroblas berbagai kelompok perlakuan setelah dipaparkan sinar UV-A.

Kontrol negatif (A); Kontrol sehat (B); SOD 12,5 mg/mL (C); SOD 25 mg/mL (D); SOD 50 mg/mL (E); SOD 100 mg/mL (F); Asam askorbat 1,25 mg/mL (G); Asam askorbat 2,5 mg/mL (H); Asam askorbat 5 mg/mL (I); Asam askorbat 10 mg/mL (J).

Keterangan:

○ = Sel hidup
○ = Sel mati

Gambar 3 menunjukkan sel fibroblas di bawah mikroskop dimana pada kelompok kontrol negatif jumlah sel fibroblas berkurang akibat terjadi kerusakan sel oleh paparan sinar UV-A. Sel dengan viabilitas menurun akan menunjukkan morfologi yang berbeda dari sel normal. Sel yang rusak menunjukkan bentuk sel yang bulat dan mengecil.

Metode yang digunakan untuk pengukuran viabilitas sel fibroblas adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu

dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Jumlah sel hidup semakin banyak jika intensitas warna ungu semakin besar (CCRC, 2009). Absorbansi sampel dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550-600 nm. Keuntungan penggunaan metode ini adalah dapat dilakukan pada semua jenis sel dengan biaya yang dikeluarkan relatif sedikit.

4. Kesimpulan

Ekstrak SOD yang diperoleh dari biji jagung dibuktikan memiliki aktivitas antioksidan dengan persen inhibisi tertinggi yaitu 65,50% pada ekstrak SOD konsentrasi presipitasi 60-90%. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan pengujian aktivitas *anti-photoaging* pada sel fibroblas 3T3 yang telah dipaparkan sinar UV-A dan memperoleh hasil perbaikan sel fibroblas dilihat dari kenaikan viabilitas sel tertinggi yaitu pada ekstrak SOD biji jagung konsentrasi 100 mg/mL dengan nilai 142,31%.

Ucapan terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Setia Budi Surakarta yang telah memberikan bantuan dana penelitian dari program hibah penelitian internal.

Daftar pustaka

- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. A. (2014). Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, 19(5), 6202-6219. <https://doi.org/10.3390/molecules19056202>
- Baharvand, H. (2015). *Stem-Cell Nanoengineering* New Jersey: Wiley Blackwell
- Baran, S. J., & K, D. D. (2010). *Teori Komunikasi Massa: Dasar, Pergolakan dan Masa Depan* Jakarta: Salemba Humanika
- Baum, J. A., Chandlee, J. M., & Scandalios, J. G. (1983). Purification and Partial Characterization of a Genetically-Defined Superoxide Dismutase (SOD-1) Associated with Maize Chloroplasts. *Plant Physiol*, 73(1), 31-35. <https://doi.org/10.1104/pp.73.1.31>
- CCRC. (2009). *Prosedur tetap Uji Sitotoksik Metode MTT* Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta.6-9
- Cheong, Y., Kim, C., Kim, M. B., & Hwang, J. K. (2018). The anti-photoaging and moisturizing effects of *Bouea macrophylla* extract in UVB-irradiated hairless mice. *Food Sci Biotechnol*, 27(1), 147-157. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0276-y>
- Choi, S. H., Choi, S. I., Jung, T. D., Cho, B. Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Yoon, S. A., Ham, Y. M., Yoon, W. J., Cho, J. H., & Lee, O. H. (2017). Anti-Photoaging Effect of Jeju Putgyul (Unripe Citrus) Extracts on Human Dermal Fibroblasts and Ultraviolet B-induced Hairless Mouse Skin. *Int J Mol Sci*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102052>

- Damayanti, N. M., & Ratnayanti, I. D. (2013). Therapeutic of Skin Aging with Carbon Dioxide Laser Skin Resurfacing And Combination With Air Cooling. *E-Jurnal Medika Udayana*, 2054-2061. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum/article/view/7340>
- Debacq-Chainiaux, F., Leduc, C., Verbeke, A., & Toussaint, O. (2012). UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol*, 4(3), 236-240. <https://doi.org/10.4161/derm.23652>
- Ebadi, P., & Fazeli, M. (2017). Anti-Photoaging Potential of Propolis Extract in UVB-Irradiated Human Dermal Fibroblast Through Increasing The Expression of FOXO3A and NGF Genes, *Biomed Pharmacother. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 47-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.019>
- Indrayati, A., Asyarie, S., Suciati, T., & Retnoningrum, D. S. (2016). Pengaruh Superoksida Dismutase Rekombinan Staphylococcus equorum terhadap Viabilitas Sel dan Deposisi Kolagen Pada Sel Fibroblas 3T3 Yang Dipaparkan UVA. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 13 (1), 34-40.
- Kartawiguna, E. (2011). *Dermatoheliosis*. Retrieved September 2019 from <https://univmed.org/wp-content/uploads/2011/02/vol.18%20no.1>
- Niyomploy, P., Boonsombat, R., Karnchanatat, A., & Sangvanich, P. (2014). A Superoxide Dismutase Purified From The Roots From Stemona tuberosa. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44(7), 663-679. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.868356>
- Park, M. A., Sim, M. J., & Kim, Y. C. (2017). Anti-Photoaging Effects of Angelica acutiloba Root Ethanol Extract in Human Dermal Fibroblasts. *Toxicol Res*, 33(2), 125-134. <https://doi.org/10.5487/tr.2017.33.2.125>
- Pratiwi, S., & Husni, P. (2017). Potensi Penggunaan Fitokonstituen Tanaman Indonesia sebagai Bahan Aktif Tabir Surya: Review.
- Rizqi, J., & Amestiasih, T. (2020). Pengaruh Kombinasi Madu dan Lidah Buaya (Aloe Vera) Terhadap Proliferrasi pada Sel Line Fibroblast NIH3T3: Studi In Vitro. *Prosiding Seminar Nasional Multi Disiplin Ilmu UNRIYO*, 2(1), 535-541.
- Sharma, S., Bahuguna, S., Nameet, K., & Chaudhary, N. (2014). Biochemical aspects of superoxide dismutase isolated from *Amaranthus spinosus*: A Therapeutically Important Plant. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 0974-3073]. 5, 35-42.
- Svobodova, A., Walterova, D., & Vostalova, J. (2006). Ultraviolet Light Induced Alteration to The Skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150(1), 25-38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Wahyu, W., Ratu, S., Rymond, R., & Marlinda, S. (2005). Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase Pada Berbagai Tanaman. *Maranatha Journal of Medicine and Health*, 5(1).
- Yong, H. J., & Ahn, J. J. (2018). Antioxidant and Skin Protection Effect of Morin Upon UV-A Exposure. *Biomedical Dermatology. Biomedical Dermatology*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41702-018-0026-7>