

EFFECT OF TOMATO (*Lycopersicum pyriforme*) FRUIT EXTRACT ON THE EXPRESSION OF COLLAGEN TYPE-1 , MMP-1 AND MMP-3 ON SKIN AGING PROCESS

EFEK EKSTRAK BUAH TOMAT (*Lycopersicum pyriforme*) TERHADAP EKSPRESI KOLAGEN TIPE 1, MMP-1 DAN MMP-3 PADA PENUAAN KULIT

Poncojari Wahyono

Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

ABSTRACT

Many theory and research was trying to explain the aging process. Free radical theory explained that all normal metabolism process in the body can produce free radical. These free radical can destroy the skin cell, and than the skin will start the aging process. The tomato extract has antioxidant such as lycopene, β -carotene and vitamin C. These antioxidant will prevent the activity of free radical, so that skin cell will not damage. The aims of this research were to study effect of tomato extract juice in preventing skin aging on wistar rats. Total of 25 rats were divided into 5 groups, consisted of 5 rats each. Group one was control group (D-0) rats were four months old, and the group two control of group rats were taken care of 4 months old until 7 months old (D-1), the other group which were under treatment classified into 3 groups. Group three were fed 7 g/kg/day/ body weight of tomato fruit extract, then taken care of 4 months old until 7 months old (D-2), group four were fed 11 g/kg/day/ body weight of tomato extract fruit, then taken care of 4 months old until 7 months old (D-3) and group five were fed 15 g/kg/day/ body weigh of tomato fruit extract, then taken care of 4 months old until 7 months old (D-4). Experiment design used was completely randomized design with five treatment and five replicates. The data were analyzed using analysis of Variance Statistics Methode and if there were differences among the treatments, The LSD Test was used. The expression of the collagen type-1, the MMP-1 and MMP-3 level were examined by immunohistochemistry, and compared with control group. The result indicated that there were significant difference ($P < 0,01$) in increase of the collagne type-1 and decreased of the MMP-1 and MMP-3. The Conclusion from this study is that the addition tomato fruit extract with dosage 11 g/kg/day/ body weight and 15 g/kg/day/ body weight fruits increased the collagen type-1 and decreased the MMP-1 and MMP-3 in skin of rats wistar on 4 months old until 7 months old. If the tomato fruits extract were given in higher dose will increased the collagen type-1 but decreased the MMP-1 and MMP-3.

Key words : *Lycopersicum pyriforme*, tomato, MMP-1, MMP-3, collagen type-1

PENDAHULUAN

Penuaan pada kulit adalah suatu proses biologik yang kompleks dan melibatkan berbagai lapisan kulit, namun demikian perubahan yang paling besar tampak pada bagian lapisan dermis (1,2). Gambaran morfologik kulit yang mengalami penuaan adalah: kulit kering, permukaan kulit kasar dan bersisik, kulit kendur/ menggelantung dengan kerutan-kerutan dan garis-garis lebih jelas dan adanya gannnguan pigmentasi pada kulit (3).

Penuaan kulit ini disebabkan karena: a) penurunan jumlah fibroblast yang menyebabkan penurunan jumlah serat elastin lebih sklerotik dan menebal sehingga jaringan kolagen menjadi kendur dan serabut elastin kehilangan daya kenyalnya, kulit menjadi tidak dapat tegang dan kurang lentur; b) tulang dan otot menjadi atrofi, jaringan lemak subkutan berkurang, lapisan kulit tipis serta kehilangan daya kenyalnya sehingga terbentuk kerutan-kerutan dan dan garis-garis kulit; c) kontraksi otot-otot mimik yang tidak diikuti oleh kontraksi kulit

yang sesuai sehngga mengakibatkan alur-alur keriput di daerah wajah (3).

Ada beberapa teori seputar penyebab penuaan, diantaranya adalah : teori "genetic clock", mutasi somatik (teori *error catastrophe*), teori rusaknya sistem imun tubuh, teori menua akibat metabolisme dan teori kerusakan akibat radikal bebas. Teori radikal bebas sering dibicarakan karena berkaitan dengan reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi terjadi saat oksigen, bahan bakar utama hidup kita, membakar dan membentuk produk alternatif yang disebut radikal bebas (4).

Radikal bebas dapat dibentuk di alam bebas. Untuk organisme aerobik, radikal bebas terbentuk pada saat respirasi aerob di dalam mitokondria, karena 90% oksigen yang diambil tubuh , masuk kedalam mitokondria. Waktu terjadi proses respirasi tersebut oksigen dilibatkan dalam mengubah bahan bakar menjadi ATP, melalui enzim-enzim respirasi di dalam mitokondria, maka radikal bebas akan dihasilkan sebagai zat antara. Radikal bebas yang terbentuk adalah: superoksida (O_2), radikal hidroksil (OH) (4). Radikal bebas juga dapat terbentuk dari

senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas, tetapi mudah menjadi radikal bebas, misalnya hidrogen peroksida (H_2O_2). Kedua kelompok senyawa ini sering disebut dengan istilah Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) atau *Reactive Oxygen Species (ROS)* (5). Reaksi-reaksi inilah yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel-sel bahkan mengalami kematian. Karena sel-sel rusak atau mati maka makhluk hidup akan mengalami penuaan. Penuaan pada kulit ditandai dengan berkurangnya produksi kolagen karena sel-sel kulit mengalami kerusakan. Berkurangnya kolagen pada jaringan kulit ini ditandai dengan adanya kekeriputan.

Senyawa Oksigen reaktif dapat berperan penting dalam penuaan kulit, sebab dapat menyebabkan deplesi dan kerusakan sistem pertahanan enzimatik dan non enzimatik kulit. Senyawa oksigen reaktif juga dapat menyebabkan kerusakan DNA, RNA, protein dan membran sel. Kerusakan-kerusakan terhadap molekul penting tersebut akan dapat berperan dalam perubahan degeneratif pada proses penuaan (6,7). Senyawa ini juga berperan dalam metabolisme kolagen, sebab kecuali mampu menghancurkan kolagen juga dapat menginduksi beberapa enzim yang berperan dalam degradasi kolagen yaitu matriks metaloproteinase (MMPs), sehingga mengakibatkan kolagen kulit mengalami penurunan (8,9). Terakumulasinya senyawa oksigen reaktif akan meningkatkan MMP-1 dan MMP-3. MMP-1 akan memecah kolagen tipe-1, sedangkan MMP-3 mampu memecah kolagen tipe IV, proteoglikan, fibronektin dan laminin. Rusaknya kolagen tipe I maupun IV ini akan mengakibatkan terjadinya penurunan produk kolagen. Terakumulasinya penurunan kolagen ini merupakan indikator pada kulit yang mengalami kekeriputan akibat proses penuaan (9).

Buah tomat (*Lycopersicon periforme*) mengandung komponen penting, yaitu vitamin C, β -karoten dan likopen yang mempunyai efek antioksidan. Dari studi yang dilakukan diketahui bahwa likopen bisa berfungsi sebagai antioksidan yang kuat. Likopen bisa bereaksi dengan radikal bebas agar berhenti merusak sel-sel. Laporan penelitian menunjukkan bahwa β -karoten sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya penyakit jantung dan kanker (10,11). Tomat mengandung sumber utama termasuk karotenoid, polyphenol, kalium, folat, asam askorbat. Zat-zat nutrisi di dalam tomat dapat bekerja sebagai tindakan preventif untuk melawan penyakit yang terkait dengan stres oksidasi, dengan melalui berbagai mekanisme aksi antioksidan (12,13,14).

Peredaman radikal bebas oleh juice buah tomat yang didalamnya terkandung vitamin C, β -karoten dan likopen akan menyebabkan tidak terganggunya fungsi biologis biomolekul seperti protein, lipid maupun asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA). Hasil Penelitian

menunjukkan bahwa pemberian juice buah tomat dengan dosis 7-15 g/kg BB ternyata mampu menurunkan kadar SGOT, SGPT dan MDA hepar tikus coba yang diinduksi dengan CCl_4 (15,16).

SGOT, SGPT dan MDA adalah merupakan produk yang dihasilkan oleh adanya radikal bebas. Ada beberapa fakta terungkap diatas, tentang kemanfaatan buah tomat dalam mencegah kerusakan sel tubuh akibat radikal bebas, namun demikian belum diungkap lebih jauh tentang kemampuan ekstrak buah tomat dalam mencegah efek radikal bebas pada kulit akibat proses penuaan. Akibat radikal bebas pada kulit adalah meningkatnya MMP-1, MMP-3, yang kemudian MMP-1 akan memecah kolagen tipe-1. Rusaknya kolagen tipe-1 akan meunurkan produksi kolagen sehingga menimbulkan keriput pada kulit (9). Adapun yang ingin dilihat dalam penelitian ini adalah efek pemberian berbagai dosis ekstrak buah tomat terhadap ekspresi MMP-1, MMP-3 dan kolagen tipe-1 pada proses penuaan kulit tikus coba dari umur 4 sampai dengan 7 bulan; serta melihat adanya hubungan antara variasi dosis ekstrak buah tomat dengan ekspresi MMP-1, MMP-3 dan kolagen tipe-1 pada tikus coba yang dipelihara dari umur 4 sampai 7 bulan.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

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

Bahan Perlakuan

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

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

Perlakuan Pada Tikus Putih

Dua puluh lima ekor tikus putih (*Rattus norvegicus galur wistar*) dengan umur 3,5 bulan dengan berat rata-rata 220 gram, diaklimatisasi terhadap lingkungan kandang di laboratorium selama 2 minggu. Secara acak tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, dengan masing-masing

kelompok sebanyak 5 tikus. Kelompok D-0 sebagai kontrol awal (tikus umur 4 bulan), kelompok D-1 (tikus umur 7 bulan). Kelompok D-2 adalah tikus yang mendapatkan pemberian ekstrak buah tomat melalui oral tiap dua hari sekali dengan dosis 7 g/kg BB mulai umur 4 sampai umur 7 bulan), kelompok D-3 dengan

dosis 11 g/kg/BB dan kelompok d-4 dengan dosis 15 g/kg/BB. Tikus dimatikan bersama setelah mendapatkan pembiusan sebelumnya dengan eter pada hari ke 90 pada pagi hari untuk pengambilan jaringan.

Tabel 1. Pemberian Perlakuan Per oral

KELOMPOK	PERLAKUAN	SASARAN WAKTU	DOSIS
D-0	Kontrol awal (umur 4 bulan)	5 tikus hari pertama	-
D-1	Kontrol akhir (umur 7 bulan)	5 tikus hari ke 90	-
D-2	Ekstrak buah tomat	5 tikus setiap 2 hari sekali selama 3 bulan	7 mg/kg BB
D-3	ekstrak buah tomat	5 tikus setiap 2 hari sekali selama 3 bulan	11 mg/kg BB
D-4	ekstrak buah tomat	5 tikus setiap 2 hari sekali selama 3 bulan	15 mg/kg BB

Pengamatan Immunohistokimia terhadap MMP-1, MMP3 dan Kolagen tipe-1

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

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Blocking endogenous peroksida menggunakan 3% H2O2 selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Blocking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Dicuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Di inkubasi menggunakan *rabbit poliklonal anti* (MMP-1, MMP3 dan kolagen tipe-1) selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan *anti rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Ditetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan diinkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Dicuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoksilin yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan *tap water*. Dibilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass. Pengamatn dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x (17).

Analisis Statistik

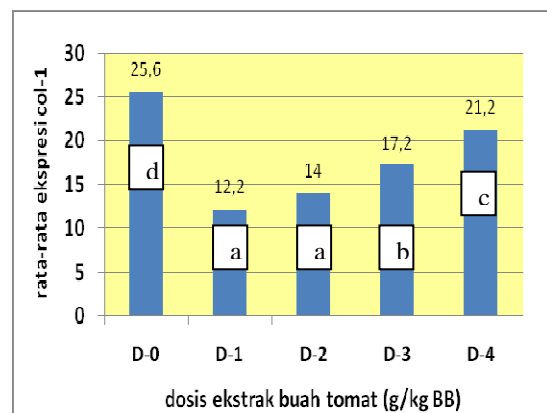
Analisis statistik menggunakan uji statistik One Way Anova pada tingkat kepercayaan $\alpha = 0,01$, dilanjutkan dengan uji statistik LSD (*Least Significance Difference*). Tingkat hubungan antara berbagai dosis ekstrak buah tomat dengan ekspresi MMP-1, MMP3 dan Kolagen tipe1 kulit punggung

tikus hewan coba dianalisis dengan menggunakan uji regresi.

HASIL PENELITIAN

Efek Pemberian Ekstrak Buah Tomat terhadap ekspresi Kolagen Tipe-1 pada Kulit Punggung Tikus Galur Wistar pada proses penuaan.

Rata-rata sel yang mengekspresikan Kolagen Tipe-1 pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik ekspresi Kolagen tipe-1 pada Jaringan Kulit pada Berbagai Pemberian Dosis Ekstrak Buah Tomat

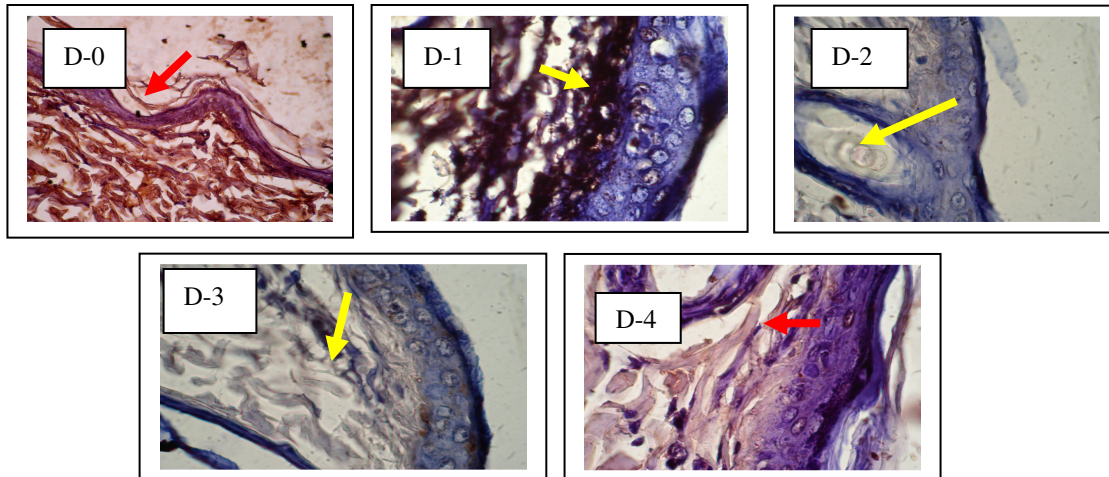
Keterangan:

Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata sel yang mengekspresikan kolagen tipe-1 yang signifikan ($p < 0,01$). D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Gambar 1 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan kolagen tipe-1 tertinggi terdapat pada kontrol umur 4 bulan (D-0)

yaitu: $25,6 \pm 3,78$, sedangkan rata-rata terendah pada kontrol umur 7 bulan yaitu: $12,2 \pm 2,28$. Hasil Uji Statistik *Oneway Anova* ($\alpha = 0,01$), menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan kolagen tipe-1 yang signifikan ($p=0,000$) antar tiap kelompok perlakuan. Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa : D-0 berbeda dengan D1, D2, D3 dan D4; D-1 berbeda dengan D-3 dan D-4; D-2 berbeda dengan D-3 dan D-4; dan D-3 berbeda dengan D-4 ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi kolagen tipe-1 pada sel kulit meningkat pada pemberian ekstrak buah tomat. Regresi linier

dengan persamaan $y = 11,29x + 0,59$ menunjukkan korelasi positif yang sangat erat ($R=0,887$), hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak buah tomat maka semakin banyak sel kulit yang mengekspresikan kolagen tipe-1. Gambar sel (Gambar 2) mengekspresikan kolagen tipe-1 akan menunjukkan warna coklat pada membran sel, selanjutnya dihitung pada 20 lapangan pandang untuk perbesaran 400x.



Gambar 2. Ekspresi Kolagen Tipe-1 Pada Sel Kulit Tikus Coba Galur Wistar Pada Masing Masing Kelompok Perlakuan Dengan Teknik Imunohistokimia (Perbesaran 400x)

Keterangan:

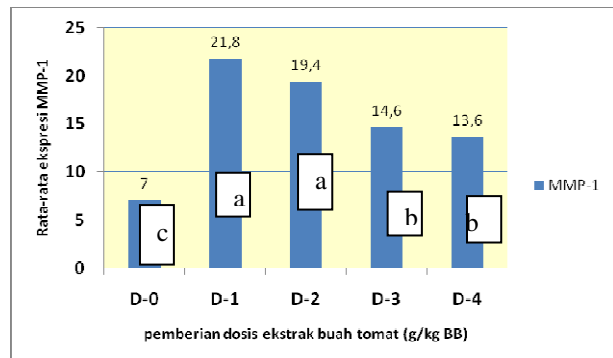
Warna coklat menunjukkan ekspresi kolagen tipe-1 (panah merah), tidak berwarna coklat (transparan) menunjukkan tidak adanya ekspresi kolagen tipe-1 (panah kuning)

D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Gambar 2 menunjukkan bahwa Kelompok kontrol (D1) didapatkan sel tikus berwarna coklat dengan jumlah lebih sedikit dari D2, D3, dan D4, dan paling banyak ditemukan pada kelompok kontrol umur 4 bulan (D0). Kelompok D0 ditemukan sel berwarna coklat dengan jumlah lebih banyak dibandingkan D1, D2, D3, dan D4.

Efek Pemberian Ekstrak Buah Tomat terhadap ekspresi MMP-1 pada Kulit Punggung Tikus Galur Wistar pada proses penuaan.

Rata-rata sel yang mengekspresikan MMP-1 pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik Ekspresi MMP-1 pada Jaringan Kulit Pada Berbagai Pemberian Dosis Ekstrak Buah Tomat

Keterangan:

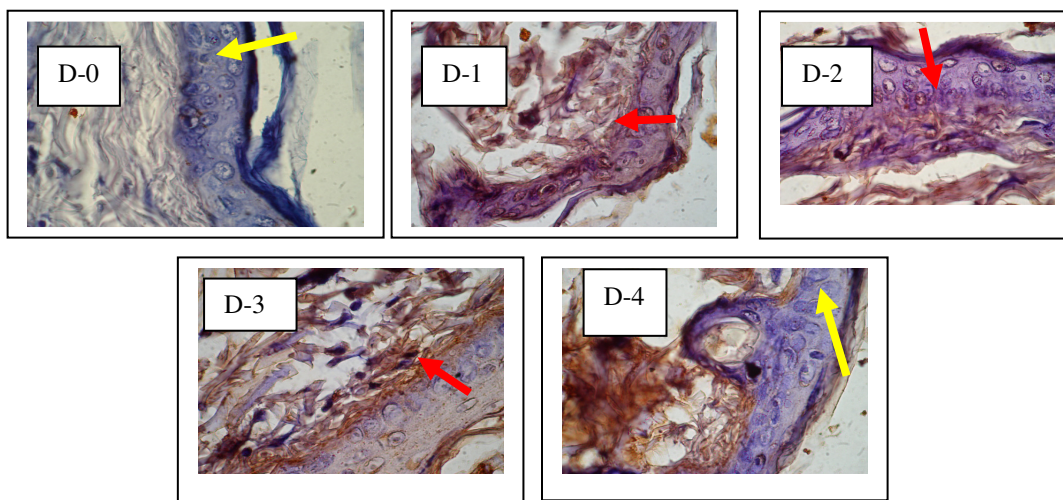
Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata sel yang mengekspresikan kolagen tipe-1 yang signifikan ($p<0,01$)

D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Gambar 3 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan MMP-1 tertinggi terdapat pada kontrol umur 4 bulan (D-1) yaitu: $21,8 \pm 2,28$, sedangkan rata-rata terendah pada kontrol umur 7(D-0) bulan yaitu: $7,00 \pm 2,34$. Hasil Uji Statistik *Oneway Anova* ($\alpha = 0,01$), menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan MMP-1 yang signifikan ($p=0,000$) antar tiap kelompok perlakuan. Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa : D-0 berbeda dengan D1, D2, D3 dan D4; D-1 berbeda dengan D-3 dan D-4; D-2 berbeda dengan D-3 dan D-4; dan D-3 tidak berbeda dengan D-4 ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa

ekspresi MMP-1 pada sel kulit meningkat pada pemberian ekstrak buah tomat. Regresi linier dengan persamaan $y = 22,2x - 0,59$ menunjukkan korelasi negatif yang sangat erat ($R=0,887$), hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak buah tomat maka semakin sedikit sel kulit yang mengekspresikan MMP-1.

Gambar sel (Gambar 4) mengekspresikan MMP-1 akan menunjukkan warna coklat pada membran sel, selanjutnya dihitung pada 20 lapangan pandang untuk perbesaran 400x dan diambil rata-rata.



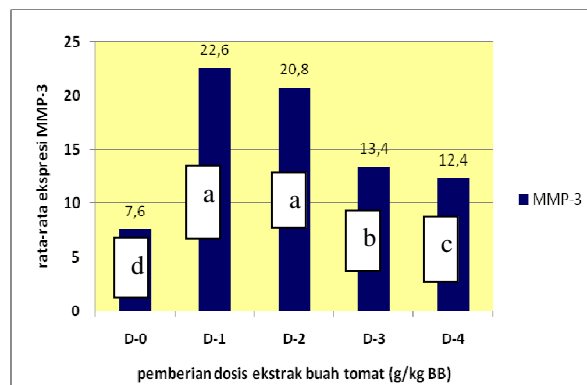
Gambar 4. Ekspresi MMP-1 pada Sel Kulit Tikus Coba Galur Wistar pada Masing Masing Kelompok Perlakuan dengan Teknik Imunohistokimia (Pembesaran 400x)

Keterangan :

Warna coklat menunjukkan ekspresi kolagen tipe-1 (panah merah), tidak berwarna coklat (transparan) menunjukkan tidak adanya ekspresi kolagen tipe-1 (panah kuning). D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Efek Pemberian Ekstrak Buah Tomat terhadap ekspresi MMP-3 pada Kulit Punggung Tikus Galur Wistar pada proses penuaan.

Rata-rata sel yang mengekspresikan MMP-3 pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 5.



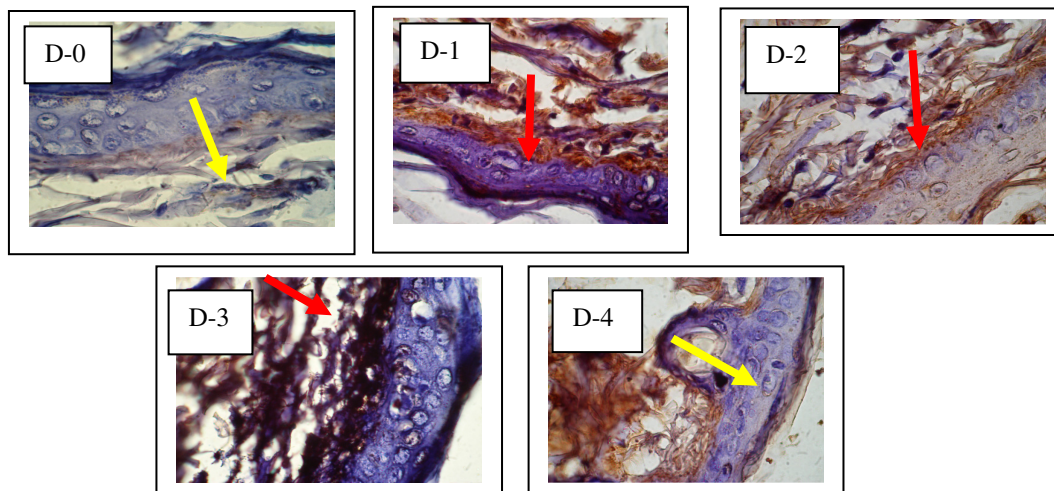
Gambar 5. Grafik Ekspresi MMP-3 pada Jaringan Kulit pada Berbagai Pemberian Dosis Ekstrak Buah Tomat

Keterangan:

Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata sel yang mengekspresikan kolagen tipe-1 yang signifikan ($p<0,01$). D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Gambar 5 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan MMP-3 tertinggi terdapat pada kontrol umur 4 bulan (D-1) yaitu: $22,6 \pm 2,07$, sedangkan rata-rata terendah pada kontrol umur 7 (D-0) bulan yaitu: $7,60 \pm 1,67$. Hasil Uji Statistik Oneway Anova ($\alpha = 0,01$), menunjukkan terdapat perbedaan rata rata jumlah sel yang mengekspresikan MMP-3 yang signifikan ($p=0,000$) antar tiap kelompok perlakuan. Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa : D-1 berbeda dengan D2, D3, D4 dan D-0; D-2 berbeda dengan D-3, D-4 dan D-0; D-3 berbeda dengan D-0 ; dan D-4 berbeda dengan D-0 ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi MMP-3 pada sel kulit

meningkat pada pemberian ekstrak buah tomat. Regresi linier dengan persamaan $y = 23,54x - 0,83$ menunjukkan korelasi negatif yang sangat erat ($R=0,898$), hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak buah tomat maka semakin sedikit sel kulit yang mengekspresikan MMP-3. Gambar sel (Gambar 6) mengekspresikan MMP-3 akan menunjukkan warna coklat pada membran sel, selanjutnya dihitung pada 20 lapangan pandang untuk perbesaran 400x dan diambil rata-rata.

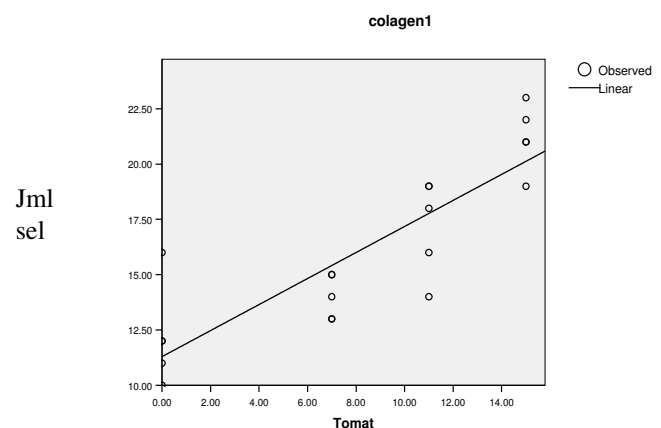


Gambar 6. Ekspresi MMP-3 pada Sel Kulit Tikus Coba Galur Wistar pada Masing-masing kelompok Perlakuan Dengan Teknik Imunohistokimia (Perbesaran 400x)

Keterangan :

Warna coklat menunjukkan ekspresi kolagen tipe-1 (panah merah), tidak berwarna coklat (transparan) menunjukkan tidak adanya ekspresi kolagen tipe-1 (panah kuning). D-0: kontrol umur 4 bulan; D-1: kontrol umur 7 bulan; D-2: pemberian ekstrak buah tomat dosis 7 g/kg BB; D-3: pemberian ekstrak buah tomat dosis 11 g/kg BB dan D-4: pemberian ekstrak buah tomat dosis 15 g/kg BB

Dari Gambar 6 di atas dapat dilihat bahwa Kelompok kontrol (D1) ditemukan sel tikus berwarna coklat dengan jumlah lebih banyak dari D2, D3, dan D4, tetapi paling sedikit ditemukan pada kelompok kontrol umur 4 bulan (D0). Kelompok D0 ditemukan sel berwarna coklat dengan jumlah lebih sedikit dibandingkan D1, D2, D3, D4. Kelompok D1 ditemukan sel berwarna coklat dengan jumlah lebih besar dibandingkan D0, D3 dan D4, tetapi tidak berbeda dengan kelompok D2.



Gambar 7. Grafik Regresi Linier Ekspresi Kolagen Tipe-1 Pada Berbagai Dosis Pemberian Ekstrak Buah Tomat

Gambar 7 menunjukkan bahwa ekspresi kolagen tipe-1 pada sel kulit meningkat pada peningkatan pemberian ekstrak buah tomat. Regresi linier dengan persamaan $y=11,29x+0,59$,

menunjukkan korelasi positif yang sangat erat ($R=0,887$), hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak buah tomat semakin banyak sel kulit yang mengekspresikan kolagen tipe-1.

DISKUSI

Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek ekstrak buah tomat dalam mencegah kerusakan kolagen di jaringan kulit bagian punggung sebagai akibat proses penuaan. Proses kerusakan kolagen pada proses penuaan ini disebabkan oleh peran radikal bebas yang semakin meningkat sebagai akibat bertambahnya umur. Pencegahan kerusakan kolagen yang ada dicerminkan oleh menurunnya enzim yang mengaktifasi kerusakan kolagen dan termasuk naiknya kolagen tipe-1 setelah mendapatkan perlakuan dengan pemberian ekstrak buah tomat dengan dosis 7 g/kg BB, 11 g/kg BB dan 15 g/kg BB. Proses mencegah proses kerusakan kolagen ini dicerminkan oleh menurunnya ekspresi MMP-1, MMP3 dan naiknya kolagen tipe-1.

Buah tomat memiliki kandungan likopen, β -karoten dan vitamin C dengan berbagai dosis terbukti meningkatkan ekspresi kolagen tipe-1 dan pada tikus yang dibiarkan mengalami penambahan umur. Respons tersebut diduga buah tomat mengandung komponen antioksidan seperti likopen, β -karoten dan vitamin C, yang dapat berfungsi sebagai pengikat dan peredam radikal bebas yang akan mengaktifasi kerusakan kolagen. Komponen antioksidan buah tomat diduga akan mengaktifasi peningkatan kolagen tipe-1 ini. Peningkatan kolagen tipe-1 kemungkinan diakibatkan oleh peran likopen, β -karoten dan vitamin C dengan cara meredam radikal bebas akibat bertambahnya umur dari 4 bulan sampai 7 bulan. Peredaman radikal bebas di dalam inti sel menyebabkan meningkatnya aktivator Protein-1 (AP-1). Meningkatnya AP-1 inilah yang akan menurunkan ekspresi MMP-1 maupun MMP3 (18). Menurunnya kedua enzim tersebut mengakibatkan kolagen tipe-1 tidak mengalami kerusakan. Dengan demikian maka kolagen tipe-1 tidak mengalami penurunan.

Matriks Metaloproteinase-1 (MMP-1) mendegradasi kolagen sedikitnya 70% kering dari berat dermis. Proses penuaan meningkatkan aktivitas MMP-1 di kulit secara in vivo. Awal ketidakseimbangan antar MMP-1 dan jaringan penghambat metalloproteinase 1/ *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase* (TIMP-1) bisa meningkatkan penuaan (19). MMP-1 diproduksi oleh keratinosit epidermal dan fibroblasts dermal sebagai respon atas berbagai stimuli, sepertinya memainkan peranan penting dalam mengubah bentuk lapisan dermis (20). Beberapa MMP diproduksi selama penyembuhan luka, seperti MMP-3 di perbaikan lapisan epidermis (21).

Di dalam sel yang hidup, radikal bebas terbentuk pada membran plasma, juga ada didalam organel-organel sel seperti peroksisom, retikulum endoplasma, mitokondria dan sitosol melalui reaksi enzimatik berantai yang berlangsung melalui proses metabolisme. Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen seperti karbohidrat, nukleotida, lipid, dan protein. Dalam keadaan normal radikal bebas ini bisa diredam oleh tubuh, karena secara alami tubuh menghasilkan antioksidan, seperti katalase dan peroksidase dismutase. Bertambahnya usia menyebabkan radikal terus meningkat sementara antioksidan alami nya tidak mencukupi. Akibatnya terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas yang dihasilkan dengan antioksidan yang ada, sehingga terbentuklah *Reactive Oxygen Species (ROS)*. ROS berperan penting pada metabolisme kolagen. Senyawa oksigen reaktif tidak saja langsung menghancurkan kolagen interstisial tetapi juga menginduksi sekelompok enzim yang bertanggung jawab dalam degradasi kolagen yaitu matriks metalloproteinase (MMPs), sehingga mengakibatkan kulit kehilangan kolagen (22,23).

Meningkatnya ROS inilah yang kemudian melalui jalur MAPK akan menurunkan *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dan meningkatkan c-Jun Kinase (JNK/p38), yang selanjutnya akan mengaktifasi peningkatan AP-1. Meningkatnya AP-1 akan menyebabkan terjadinya peningkatan MMP-1 (*collagenase*). Selanjutnya peningkatan MMP-1 dan MMP-3 ini akan mengaktifasi terhadap penurunan pro-kolagen-1. Karena kolagen tipe-1 yang dihasilkan menurun, maka kolagen yang diproduksi oleh sel kulit itu juga akan mengalami penurunan. Aktivitas radikal bebas dan ROS ini akan mengaktifasi AP-1 melalui jun kinase melalui jalur MAPK (*The mitogen-activated protein kinase*). Yang termasuk jalur ini, adalah ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) dan p38. ERK mempengaruhi aktivitas jun. Aktivitas p38 dan ERK dapat mengaktifasi AP-1. Ketiga jalur MAPK dapat diaktifasi dalam waktu yang sama (24,25).

Pemberian ekstrak buah tomat dengan komponen likopen, β -karoten dan vitamin C, dapat menaikkan jumlah kolagen tipe-1, meskipun belum bisa untuk memprediksi secara langsung dapat mencegah kerusakan kulit atau tidak, namun dengan jumlah kolagen tipe-1 yang tidak jauh berbeda dengan ketika masa mudanya (kontrol umur 4 bulan) maka dapat disimpulkan bahwa kolagen yang diproduksi juga akan mengalami peningkatan. Jumlah kolagen tipe-1 yang lebih sedikit dari kelompok kontrol (umur 7 bulan) dapat digunakan sebagai parameter terjadinya proses penuaan pada kulit. Penelitian ini menunjukkan jumlah kolagen tipe-1 yang semakin meningkat dengan semakin tinggi dosis ekstrak buah tomat, dimana dosis 15 mg/kg BB terlihat jumlah

kolagen tipe-1 nya semakin meningkat (Gambar 7). Peningkatan jumlah kolagen tipe-1 ini diduga karena kandungan (likopen, β -karoten dan vitamin C) yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan dapat meredam radikal bebas sehingga ROS tidak terbentuk, akibatnya ERK naik dan c-Jun Kinase turun, dan menyebabkan AP-1 turun, dan MMP-1 juga menurun. Dengan demikian maka (kolagen tipe-1) tidak mengalami kerusakan, sehingga kolagen yang diproduksi tidak mengalami penurunan. MMP-1 adalah enzim yang dapat menginisiasi terjadinya kerusakan kolagen pada pH netral (26).

Jumlah kolagen tipe-1 pada pemberian berbagai dosis ekstrak buah tomat menunjukkan kecenderungan bahwa semakin ditambah dosisnya semakin meningkat pula jumlah kolagen tipe-1 nya (berkorelasi positif). Disamping itu juga terlihat ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang satu dengan yang lain. Sebaliknya Jumlah MMP-1 dan MMP-3 pada pemberian berbagai dosis ekstrak buah tomat menunjukkan kecenderungan semakin ditambah dosisnya semakin menurun jumlah MMP-1 dan MMP-3 (berkorelasi negatif). Disamping itu juga terlihat ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang satu dengan yang lain.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Kochevar Irene E. *Molecular and cellular effects of UV radiation relevant to chronic photodamage*. In: Gicherst BA. *Photodamage*, New York: Blackwell Science; 1995;52-67
2. Frank R. De Gruji. *Photocarcinogenesis:UV vs UB Radiation*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15: 16-20.
3. Kabulrachman. *Problema Dermatologik pada Usia Lanjut* dalam: Darmojo R B. Dan Martono H, Geratri (ilmu Kesehatan Usia Lanjut). Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2004; 449-451.
4. Darmojo RB. *Teori Proses Menua*. Di dalam: Darmojo RB dan Martono HH, Geriatri (ilmu Kesehatan Usia Lanjut), edisi ke-3. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2004; 4-8.
5. Winarsi H. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta; 2007;11-23.
6. Yaar M, Gilchrest BA, Aging of Skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, (eds). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine 5th* ed. New York: McGraw-Hill; 2003;1386-98.
7. Beckman Keneth B. Bruce N. Amies. *The Free radical theory of Aging matures*. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
8. Dalle CM, Pathak MA. *Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging*. *Photochem Photobiol*. 1992;14:105-24.
9. Pinnell SR. *Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection*. *J Am Acad Dermatol* 2003;14:1-19
10. Giovannucc E., *Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of epidemiologic literature*. 1999, *J Natl Cancer Inst* 91;317-331.
11. Sesso HD, Liu S, Gaziano JM, Buring JE. *Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women*. 2003, *J Nutr* 133:2336-2341.
12. Rao AV, Argawal S. *Role of Antioxidant lycopene in Cancer and heart desease*. *J Am Coll Nutr* 2000;19: 563-569.
13. Rao AV. *Lycopene, tomatoes, and prevention of coronary heart desease*. *Exp Biol Med* 2002; 227:908913
14. Cenene-Adam K, Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, Erdman JW, *The tomato as a functional food.*, *J Nutr*, 2005; 135:1226-1230
15. Wahyono P. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Tomat (Lycopersicum pyriforme) dalam Mencegah Kerusakan Hepar*. Laporan Penelitian Fundamental, Lembaga Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang; 2006
16. Wahyono P. *Pengaruh Pemberian sari Buah Tomat (Lycopersicum pyriforme) terhadap efek hepatotoksik CCl₄ pada tikus Putih*. Prosiding Konggres X Ikatan Farmakologi Indonesia, Malang, 15-18 nopember 2000.

KESIMPULAN

1. Pemberian ekstrak buah tomat menimbulkan efek peningkatan ekspresi kolagen tipe-1 dan penurunan MMP-1 dan MMP3 pada kulit tikus yang mengalami perubahan umur dari 4 sampai dengan 7 bulan.
2. Ekstrak buah tomat (*Lycopersicum pyriforme*) dengan dosis 11 g/kg BB dan 15 g/kg BB dapat menaikkan ekspresi kolagen tipe-1 dan menurunkan ekspresi MMP-1 dan MMP-3 pada kulit tikus yang mengalami perubahan umur dari 4 sampai 7 bulan.
3. Pada proses penuaan umur 4 sampai 7 bulan tikus hewan coba, ada korelasi positif antara peningkatan pemberian dosis ekstrak buah tomat terhadap ekspresi kolagen tipe-1 dengan persamaan regresi $y = 11,29x + 0,59$, dan ada korelasi negatif antara peningkatan pemberian dosis ekstrak buah tomat terhadap ekspresi MMP-1 dan MMP-2, dengan persamaan regresi untuk MMP-1 adalah $y = 22,2x - 0,59$ dan MMP-3 adalah $y = 23,54x - 0,83$

17. Pizem J, Cor A., *Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section*, Radiol. Onco, 2003; 37(4): 225-232
18. Shin MH, Rhie G, Kim YK, et al. *H₂O₂ Accumulation by Catalase Reduction Changes MAP Kinase Signaling in Aged Human Skin In Vivo*. Journal Invest Dermatology 125, Seoul, 2 August 2005; 221-229.
19. Lahmann C, Bergemann J, Harrison G, Young AR. *Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers*. The Lancet, 2001; 357: 935-6.
20. Twining SS. *Regulation of proteolytic activity in tissues*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1994; 29: 315-83.
21. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, et.al. *Impaired wound contraction in stromelysin -1-deficient mice*. Ann Surg, 1999; 97: 4052-7.
22. Dalle CM, Pathak MA. *Skin Photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging*. Photochem photobiol 1992; 14: 105-24.
23. Pinnell SR,. *Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection* . J Am Acad Dermatol 2003; 48: 1-19.
24. Wang, L., B. Walia, J. Evans, A. Gewirtz, D. Merlin and S. Sitaraman (2003). *"IL-6 Induces NFkB Activation in the Intestinal Epithelia."* The Journal of Immunology 171: 3194-3201.
25. Outburg S. Joke S., Janneke E., et al. *BMC Infectious Diseases*, Journal of Translational Medicine. vol. 5:114; 2005; 1471-1486.
26. Ikeda U., Shimpo M., Ohki R., et al. *Fluvastatin Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells*, Hypertension, 2000;36:325-338