



HASIL PENELITIAN

Krim Ekstrak Bawang Hitam (*Allium sativum Linn*) Mencegah Peningkatan Ekspresi MMP-1 dan Penurunan Jumlah Kolagen Dermis Kulit Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Jantan yang Dipapar Sinar UV-B

Balqis Wasliati, Wimpie Pangkahila, A.A.G.P Wiraguna

Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar, Bali, Indonesia

ABSTRAK

Pendahuluan: Bawang hitam berasal dari bawang putih (*Allium sativum Linn*) melalui proses pemanasan, sehingga terjadi peningkatan kandungan antioksidan: fenolik, flavonoid (quarcelin), dan DPPH (IC-50). Tujuan penelitian ini adalah membuktikan krim ekstrak bawang hitam (*Allium sativum Linn*) mencegah peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen dermis pada kulit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan yang dipapar sinar UV-B. **Metode:** Penelitian ini adalah penelitian eksperimental post-test only control group design. Sampel penelitian ini terdiri dari 36 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan, dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan secara acak. Tikus diberi bahan dasar krim dan dipapar sinar UV-B disebut kelompok kontrol, tikus diberi krim ekstrak bawang hitam 15% dan dipapar sinar UV-B disebut kelompok perlakuan. Total dosis UV-B 840 mJ/cm² selama 4 minggu. Setelah perlakuan, tikus dieuthanasia dengan ketamine-xylazine lalu ekspresi MMP-1 diperiksa secara imunohistokimia dan jumlah kolagen dermis kulitnya menggunakan pewarnaan Pico-Sirius-Red. **Hasil:** Rerata ekspresi MMP-1 kelompok kontrol 28,58% dan kelompok perlakuan 8,60%; p<0,001 (ujji t independent); terdapat perbedaan bermakna ekspresi MMP-1 antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Rerata jumlah kolagen kelompok kontrol 57,53% dan kelompok perlakuan 83,80%; p<0,001 (ujji t independent); terdapat perbedaan bermakna jumlah kolagen antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. **Simpulan:** Krim ekstrak bawang hitam (*Allium sativum Linn*) 15% mencegah peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen dermis kulit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan yang dipapar sinar UV-B.

Kata kunci: Ekspresi MMP-1, jumlah kolagen, krim ekstrak bawang hitam, UVB

ABSTRACT

Aim: Black garlic was produced from garlic (*Allium sativum Linn*) through the heating process to increase the antioxidant content: phenolic, flavonoid (quarcelin), and DPPH (IC-50). The aim of this study is to prove that black garlic extract cream (*Allium sativum Linn*) application prevents enhancement of MMP-1 expression and reduction of dermal collagen in male Wistar rat (*Rattus norvegicus*) skin which has been exposed to UV-B light. **Method:** An experimental research using post-test only control group design. Total samples of 36 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 2 groups. Control group were given cream and UV-B exposure (P0), treatment group were given 15% black garlic cream extract and UV-B exposure (P1). The total dose of UV-B was mJ/cm² for 4 weeks. The rats were euthanized with ketamine-xylazine after treatment; MMP-1 expression was examined using immunohistochemistry and dermal collagen using Pico-Sirius-Red staining. **Result:** MMP-1 expression of control group 28.58% and of treatment group 8.60% (independent t test, p<0.001). Mean of collagen in control group 57.53% and in treatment group 83.8% (independent t test, p<0.001). **Conclusion:** Black garlic extract cream 15% prevents the enhancement of MMP-1 expression and the reduction of dermal collagen in male Wistar rat (*Rattus norvegicus*) skin which has been exposed to UV-B light. Balqis Wasliati, Wimpie Pangkahila, AAGP Wiraguna. Black Garlic (*Allium sativum Linn*) Extract Cream Prevents The Increase of MMP-1 Expression and The Decrease of Dermal Collagen in Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed to UV-B Light

Keywords: Amount of collagen, black garlic extract cream, MMP-1 expression, UVB

PENDAHULUAN

Dua faktor dasar yang mempengaruhi proses penuaan adalah faktor internal dan faktor eksternal. Beberapa faktor internal penyebab proses penuaan ialah radikal bebas,

perubahan kadar hormon, proses glikosilasi, metilasi, apoptosis, sistem kekebalan yang menurun, dan gen. Sedangkan faktor eksternal yang utama ialah gaya hidup tidak sehat, diet tidak sehat, kebiasaan salah, polusi

lingkungan, stres, dan kemiskinan.¹ Proses penuaan seharusnya dapat dicegah dengan menghindari faktor-faktor yang mempercepat proses tersebut.²

Alamat Korespondensi email: balqiswasliati@gmail.com

HASIL PENELITIAN



Matahari adalah sumber kehidupan, namun pajaian sinar matahari khususnya sinar UV-B mengakibatkan terbentuknya radikal bebas, yaitu *reactive oxygen species* (ROS) yang diketahui sebagai faktor intrinsik penyebab penuaan. Radikal bebas dianggap sebagai penyebab utama dan paling banyak berkontribusi dalam proses penuaan.³

Pada kulit, ROS yang terbentuk akibat sinar UV menimbulkan stres oksidatif, mengaktifasi reseptor permukaan sel, yaitu *TGF β receptor* dan *cytokine receptor*, dengan demikian signal transduksi intraseluler akan meningkat sehingga *c-jun* dan *c-fos* juga ikut meningkat.⁴ Hal ini akan menyebabkan *activator protein-1* (AP-1) ikut meningkat, mengganggu integritas matriks ekstrasel dengan menginduksi *matriks metalloproteinase* (MMPs) sebagai enzim yang mendegradasi kolagen, khususnya MMP-1 (*kolagenase*), sehingga mempengaruhi jumlah kolagen dermis.⁴ Pajaian sinar UV selama beberapa jam akan membentuk MMPs khususnya gelatinase dan kolagenase yang pada akhirnya menurunkan jumlah kolagen pada lapisan dermis.⁴

Berkurangnya jumlah kolagen dermis akan mengakibatkan terbentuknya garis halus keriput. Keriput (*winkle*) merupakan tanda yang paling terlihat pada penuaan kulit akibat sinar matahari.⁵ Penuaan kulit akibat pajaian kronis sinar UV matahari dikenal sebagai *photoaging*. Antioksidan diketahui memiliki kemampuan menghambat terbentuknya ROS.

Indonesia adalah negara yang kaya akan berbagai macam tanaman dan salah satu yang banyak dimanfaatkan adalah bawang putih (*Allium sativum Linn*). Kandungan *caffeic acid*, *S-allyl systeine* (SAC), dan *uracil*, yang diisolasi dari bawang putih dapat memodulasi formasi keriput yang diinduksi UV-B dan mempengaruhi ekspresi pensinyalan matriks *metalloproteinase* (MMP) dan NF- κ B.⁵ Bawang putih segar (*Allium sativum Linn*) setelah melalui proses pemanasan akan menjadi bawang hitam. Kadar antioksidan optimal adalah pada suhu 70°C dengan kelembapan 90% selama 21 hari.⁶ Bawang hitam mengandung antioksidan fenolik, flavonoid, *S-Allylcystein*, dan aktivitas penangkal radikal-DPPH yang kuat.⁷ Namun berdasarkan pemeriksaan fitokimia, kandungan antioksidan ekstrak bawang hitam menggunakan etanol 70% dalam penelitian ini hanya antioksidan

fenolik, flavonoid (*quarcelin*); kadar SAC tidak dapat ditemukan karena memerlukan pemeriksaan khusus.

Flavonoid terdiri dari 6 subkelas, yaitu flavon, flavonol, flavanonolol, isoflavan, flavanol, dan antosianin. Senyawa flavonol adalah senyawa flavonoid yang terbanyak kandungannya dalam bawang hitam.⁵ *Quarcelin* adalah jenis antioksidan golongan flavonol yang paling poten. *Quarcelin* menyerap radiasi UV, sehingga mencegah pembentukan ROS dan kerusakan DNA secara langsung.⁸ *Quarcelin* memiliki efek menghambat degradasi kolagen melalui hambatan pada MAP-kinase dan pembentukan MMP-1.⁸ Hambatan pada MMP-1 akan menghambat degradasi kolagen, sehingga memperbaiki struktur dan kandungan kolagen kulit.⁸ Pada penelitian *in vitro*, pemberian ekstrak bawang hitam meningkatkan viabilitas sel fibroblas, menghambat peningkatan degradasi kolagen, dan tidak menghambat penurunan deposisi kolagen pada kultur fibroblas kulit manusia yang dipajan sinar UV-B.⁷

Adanya potensi manfaat antioksidan dalam bawang hitam khususnya fenolik, flavonoid (*quarcelin*), menimbulkan dugaan pemberian krim ekstrak bawang hitam dapat mencegah peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen dermis pada kulit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan yang dipapar sinar UV-B.

MATERI DAN METODE

Bawang hitam untuk pembuatan krim berasal dari Balai Bioteknologi BPPT. Krim ekstrak bawang hitam yang digunakan untuk penelitian ini mengandung 15% ekstrak bawang hitam dan bahan dasar krim. Komposisi bahan dasar krim yang digunakan adalah *cerra alba*, sodium lauril sulfat, vaselin alba, propilen glikol, dan *aquadest*.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan *post-test only control group design*. Jumlah sampel penelitian terdiri dari 36 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan, dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan. Selama perlakuan, 4 ekor tikus mati (2 ekor dari masing-masing kelompok). Dengan demikian, jumlah sampel penelitian ini menjadi 32 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan, dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan (16 ekor tiap kelompok perlakuan). Kematian tikus karena

tidak mampu menyesuaikan diri dengan lingkungan sehingga tikus stres dan mati, meskipun telah diadaptasi selama 7 hari. Tikus diberi bahan dasar krim dan dipapar sinar UV-B termasuk kelompok kontrol (P0), tikus diberi krim ekstrak bawang hitam 15%, dan dipapar sinar UV-B termasuk kelompok perlakuan (P1). Total dosis UV-B yang diberikan adalah 840 mJ/cm² selama 4 minggu. Setelah empat minggu perlakuan, tikus dieuthanasia dengan *ketamine-xylazine*; jaringan kulit dermis punggung tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan diambil dengan pisau 2x2 cm untuk pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi MMP-1 diperiksa secara imunohistokimia dan jumlah kolagen dermis kulit diperiksa menggunakan pewarnaan *Pico-Sirius-Red*.

HASIL

Berikut disajikan ekspresi MMP-1 pada jaringan kulit dermis punggung tikus yang diamati dengan mikroskop pembesaran 400x (**Gambar 1**).

Hasil pemeriksaan histopatologi jaringan kolagen berwarna merah pada pemeriksaan *Pico-Sirius Red*. Berikut disajikan jumlah kolagen pada jaringan kulit dermis punggung tikus yang diamati dengan mikroskop pembesaran 400x (**Gambar 2**).

Hasil analisis deskriptif ekspresi MMP-1 dan jumlah kolagen dermis masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **tabel 1**. Rata-rata nilai ekspresi MMP-1 kelompok kontrol adalah 28,58%. Nilai minimum 23,87% dan nilai maksimum 33,84%, sedangkan rata-rata nilai ekspresi MMP-1 kelompok perlakuan adalah 8,60%. Nilai minimum 3,57% dan nilai maksimum 12,35%. Rata-rata nilai jumlah kolagen dermis kelompok kontrol adalah 57,53%. Nilai minimum 51,65% dan nilai maksimum 62,54%. Sedangkan rata-rata jumlah kolagen dermis pada kelompok perlakuan adalah 83,80%. Nilai minimum 78,32% dan nilai maksimum 87,88%.

Analisis komparatif dilakukan untuk membandingkan rerata ekspresi MMP-1 dan jumlah kolagen dermis antar kelompok. Hasil analisis kemaknaan diuji dengan *Independent sample t test* karena data berdistribusi normal ($P>0,05$) dan varian data homogen ($P>0,05$). **Tabel 2, Gambar 3, Gambar 4** menunjukkan perbandingan data antar kelompok sesudah perlakuan.



HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif ekspresi MMP-1 dan jumlah kolagen dermis

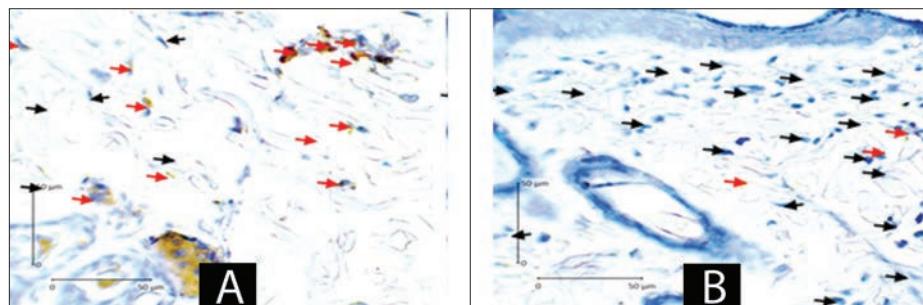
Variabel	Kelompok	n	Rerata	SB	Median	Min	Maks
Ekspresi MMP-1 (%)	Kontrol	16	28,58	2,80	28,74	23,87	33,84
	Krim EBH	16	8,60	2,65	8,73	3,57	12,35
Jumlah Kolagen (%)	Kontrol	16	57,53	2,99	57,81	51,65	62,54
	Krim EBH	16	83,80	2,53	84,56	78,32	87,88

Ket.: n = jumlah sampel; SB = simpang baku

Tabel 2. Perbandingan antar kelompok sesudah perlakuan

Variabel	Kelompok	Rerata	SB	p
Ekspresi MMP-1	Kontrol	28,58	2,80	0,001
	Krim EBH	8,60	2,65	
Jumlah Kolagen	Kontrol	57,53	57,81	0,001
	Krim EBH	83,80	84,56	

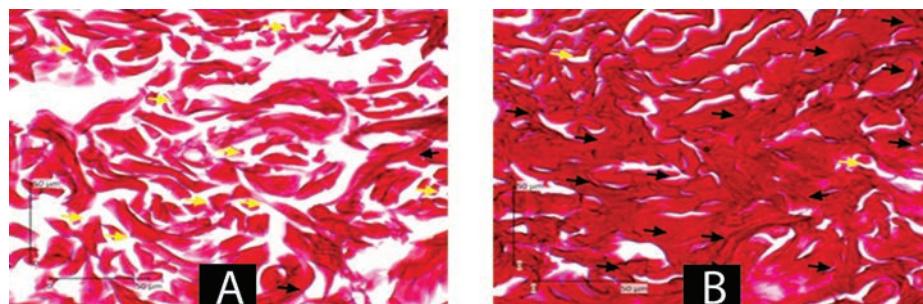
Ket.: SB = simpang baku; P = signifikansi



Gambar 1. Ekspresi MMP-1 pada jaringan dermis tikus dengan pembesaran 400x dan pengecatan IHK

Keterangan gambar 1:

- Kelompok kontrol. Tampak ekspresi MMP-1 (warna coklat) lebih banyak dibandingkan gambar B kelompok perlakuan. Tanda panah merah menunjukkan sel fibroblas yang mengekspresikan MMP-1. Tanda panah hitam menunjukkan sel fibroblas yang tidak mengekspresikan MMP-1.
- Kelompok perlakuan. Tampak ekspresi MMP-1 (warna coklat) lebih sedikit dibandingkan gambar A kelompok kontrol. Tanda panah merah menunjukkan sel fibroblas yang mengekspresikan MMP-1. Tanda panah hitam menunjukkan sel fibroblas yang tidak mengekspresikan MMP-1.



Gambar 2. Ekspresi kolagen jaringan dermis tikus dengan pembesaran 400x dan pengecatan Picro-Sirius Red

Keterangan gambar 2:

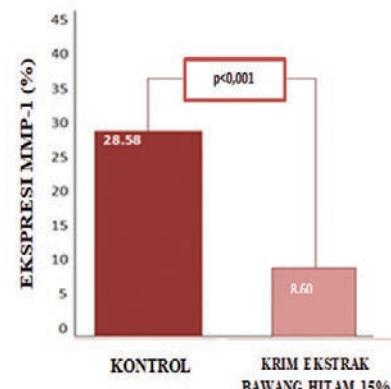
- Kelompok kontrol. Terjadi kerusakan susunan dan struktur kolagen dengan serat kolagen berwarna merah yang tampak tipis. Tanda panah hitam menunjukkan serat kolagen yang utuh. Tanda panah kuning menunjukkan serat kolagen yang tidak utuh.
- Kelompok perlakuan. Tampak kolagen dengan serat berwarna merah yang lebih lebar dan tebal. Tanda panah hitam menunjukkan serat kolagen yang utuh. Tanda panah kuning menunjukkan serat kolagen yang tidak utuh.

Gambar 3 menunjukkan perbedaan rerata ekspresi MMP-1 pada kelompok kontrol 28,58% dan kelompok perlakuan 8,60%. Analisis kemaknaan dengan *Independent sample T test* menunjukkan nilai $p < 0,001$; berarti kedua kelompok memiliki rerata

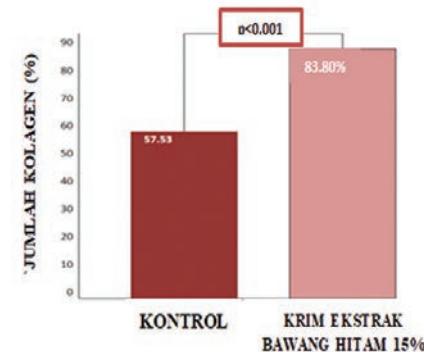
ekspresi MMP-1 yang berbeda bermakna ($P < 0,05$).

Gambar 4 menunjukkan perbedaan rerata jumlah kolagen antar kelompok kontrol 57,53% dan kelompok perlakuan 83,80%.

Analisis kemaknaan dengan *Independent sample T test* menunjukkan $p < 0,001$. Hal ini berarti kedua kelompok memiliki rerata jumlah kolagen yang berbeda bermakna ($p > 0,05$).



Gambar 3. Perbedaan rerata ekspresi MMP-1 antar kelompok



Gambar 4. Perbedaan rerata kolagen antar kelompok

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian fitokimia kandungan antioksidan ekstrak bawang hitam menggunakan ekstrak etanol 70%, diketahui bahwa bawang hitam mengandung antioksidan fenolik, flavonoid, S-Allylcysteine (SAC).⁷ Fenolik mempunyai berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen serta pendonor elektron.⁹ Flavonoid yang sebenarnya pigmen pemberi warna khas pada tumbuhan merupakan salah satu dari kelompok senyawa fenolik. Flavonoid terdiri dari 6 subkelas yaitu flavon, flavonol, flavanonolol, isoflavon, flavanol, dan antosianin. Senyawa flavonol adalah senyawa flavonoid yang terbanyak dalam bawang hitam.⁵ Salah satu golongan flavonol terkuat adalah *quercetin*. Bawang hitam mengandung flavonoid 1,06% b/b

HASIL PENELITIAN



elivalen *quarcelin* yang berarti dalam 100 mg bahan terdapat 1,06 mg flavonoid yang kekuatannya setara dengan *quarcelin*.⁷ *Quarcelin* telah terbukti melindungi sistem antioksidan kulit (*glutathione peroxidase*, *glutathione reeducates catalase*, dan *superoxide dismutase*). Fotoproteksi *quarcelin* adalah dengan menyerap radiasi UV, sehingga mencegah pembentukan ROS dan kerusakan DNA secara langsung.⁸ *Quarcelin* memiliki efek menghambat degradasi kolagen melalui hambatan pada MAP-kinase dan pembentukan MMP-1. Hambatan pada MMP-1 akan menghambat degradasi kolagen, sehingga memperbaiki struktur dan kandungan kolagen kulit.⁸

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan

bermakna nilai rerata peningkatan ekspresi MMP-1 antara kelompok kontrol sebesar 28,58% dan kelompok perlakuan sebesar 8,60% ($p<0,001$) serta perbedaan bermakna nilai rerata penurunan jumlah kolagen antara kelompok kontrol sebesar 57,53% dan kelompok perlakuan sebesar 83,80% ($p<0,001$). Pajanan sinar UV-B selama 4 minggu dengan total dosis 840 mJ/cm² pada kelompok kontrol yang hanya diberi bahan dasar krim menyebabkan peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen. Sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberi krim ekstrak bawang hitam 15% tampak efek pencegahan terhadap peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen. Ekstrak bawang hitam dalam penelitian ini adalah sebagai

sumber antioksidan topikal yang mampu menghambat penyerapan sinar UV-B dan terbentuknya ROS, sehingga tidak terjadi stres oksidatif yang akan memicu aktivasi *Activator Protein-1* (AP-1) dan mengganggu integritas matriks ekstrasel dengan menginduksi *matrix metalloproteinase* (MMPs), khususnya MMP-1 sebagai enzim yang mendegradasi kolagen; sehingga dengan mencegah peningkatan MMP-1 berarti penurunan jumlah kolagen juga ikut dicegah.

SIMPULAN

Krim ekstrak bawang hitam (*Allium sativum Linn*) 15% terbukti mencegah peningkatan ekspresi MMP-1 dan penurunan jumlah kolagen dermis kulit tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar jantan yang dipapar sinar UV-B.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pangkahila W. Tetap muda, sehat dan berkualitas: Konsep anti-aging medicine. Jakarta: Kompas Media Nusantara; 2017. p. 1-115.
2. Bauman L, Saghari S, Weisberg E. Basic science of the dermis: Cosmetic Dermatology. 2nd ed. New York: Mc Graw Hill; 2009. p.8-42.
3. Pangkahila W. Anti aging medicine: Tetap muda dan sehat. Jakarta: Kompas; 2011. p. 151- 92.
4. Rhein LD, Santiago JM. Matrix metallo proteinase, fibrosis, and regulation by transforming growth factor beta: A new frontier in wrinkle repair. USA: Allu Red Bussiness Media; 2010. p. 26-81.
5. Kim RS, Jung RY, An JH, Kim DH, Jang EJ, Choi YJ, et al. Anti-wrinkle and anti-inflammatory of active garlic components and the inhibitor of MMPs via NF-κB signaling. Plos One 2013;8(9):73877
6. Choi SI, Cha SH, Lee YS. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. Molecules. 2014;19(10):16811-23.
7. Anggreni F. Pemberian ekstrak bawang hitam meningkatkan viabilitas sel fibroblas, menghambat peningkatan degradasi kolagen, dan tidak menghambat penurunan deposisi kolagen pada kultur fibroblas kulit manusia yang dipajan sinar UVB. Denpasar: Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana; 2018. p. 1-86
8. Saewan N, Jimtaisong A. Photoprotection of natural flavonoid. J Applied Pharmaceut Sci. 2013;3(09):129-41
9. Sayuti K, Yenrina R. Antioksidan, alami dan sintetik. Padang: Andalas University Press; 2015.