

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Antioksidan

Antioksidan yaitu senyawa yang dapat memperlambat oksidasi dengan konsentrasi yang cukup rendah dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi radikal bebas (Liyonawati, 2013). Antioksidan termasuk pertahanan pertama dalam tubuh yang dapat melawan dampak negatif dari radikal bebas. Mekanisme antioksidan dengan cara menghambat biasanya akan terjadi pada saat reaksi-reaksi ini terinisiasi atau propagasi pada reaksi oksidasi lemak atau molekul yang ada pada tubuh dengan cara diserap dan menetralkan radikal bebas atau mendekomposisi peroksida. Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan eksogen atau antioksidan yang dapat berasal dari luar tubuh terdiri dari vitamin E, vitamin A, statin, niasin, organosulfur, tocopherol, provitamin A, flavonoid, dan phycocyanin. Sedangkan yang termasuk pada antioksidan endogen yaitu Enzim-enzim yang terdapat didalam tubuh seperti *superoksida dismutase* (SOD), glutathion peroksidase, katalase. Salah satu antioksidan yang menjadi lini pertahanan pertama yaitu *superoksida dismutase* (SOD)

II.2 Sumber Radikal Bebas dan ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Sinar Ultraviolet yaitu merupakan sebagian kecil spektrum dari sinar matahari yang memiliki efek sangat berbahaya. Sinar UV memiliki tiga jenis yaitu sinar UVA dengan panjang gelombang yang paling tinggi yaitu 315-400nm dapat menembus hingga ke lapisan dermis, UVB dengan panjang gelombang 280-325nm dapat menembus hingga ke lapisan epidermis, dan UVC memiliki panjang gelombang yang cukup rendah 100-280 nm dan hanya dapat menembus lapisan ozon. dari ketiga jenis sinar UV ini yang paling berbahaya bagi tubuh yaitu sinar UVA dan UVB karena memiliki panjang gelombang yang sangat tinggi sehingga dapat menembus lapisan ozon sampai ke lapisan epidermis pada kulit (Wilda, 2020). Sinar UV merupakan salah satu faktor eksternal penyebab terjadinya radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS ini terdiri dari superoksida ($\text{O}_2^{\cdot -}$), oksida nitrit ($\text{NO}^{\cdot}$), hydrogen peroksida (H_2O_2), peroksil ($\text{ROO}^{\cdot}$). Selain sinar UV ada beberapa faktor eksternal lain yang dapat menyebabkan radikal bebas ROS seperti asap rokok, logam berat, polutan, hyperoxia (kadar oxygen yang lebih tinggi dari tekanan parsial pada paru-paru) (Mareta, 2020).

Radikal bebas merupakan atom, molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri, yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan pada orbital yang paling luar. Radikal bebas

dapat melepaskan elektron pada molekul sekitar yang dapat menghasilkan pasangan elektron sehingga menjadikan molekul yang stabil (Liyonawati, 2013). Ada beberapa efek negatif yang akan terjadi terutama pada kulit jika tidak diimbangi dengan antioksidan, salah satu efek yang terjadi yaitu penuaan dini (foto-aging). Penuaan dini ini merupakan perubahan pada struktur organisme yang dapat terjadi secara alami seiring berjalannya waktu. Penuaan ini diakibatkan oleh paparan sinar matahari secara langsung (Marcelina *et.al* 2015). Beberapa tanda terjadinya penuaan dini yaitu pigmentasi kulit yang tidak merata, kulit kering, kasar, pucat, berkerut dan menurunnya ke elastisitasan kulit (Indrayati *et al.*, 2016).

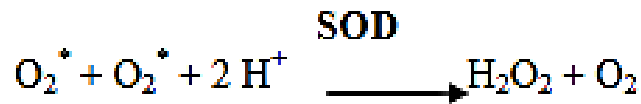
II.2.1 Mekanisme Penuaan (Foto-aging)

Sinar UV dapat menginduksi terbentuknya ROS hingga menimbulkan terjadinya stres oksidatif. ROS memiliki sifat yang agresif, reaktif dan dapat memicu aktivasi *inducible nitric oxide synthase* (iNO) yang merupakan salah satu jenis dari *reactive nitrogen species* (RNS). iNOS ini dapat meningkatkan produksi *nitric oxide* (NO) yang dapat secara cepat bereaksi dengan ion superoksida dan dapat membentuk *peroxynitrite* (ONOO^-) bentuk ini dapat menyebabkan efek toksik seperti oksidasi protein, peroksidasi lipid dan kerusakan DNA. Selain itu peroksinitrit juga dapat menginduksi faktor dari transkripsi kappa B (NF-kB) yang menimbulkan terjadinya inflamasi kronis, serta dapat menginduksi *activator protein 1* (AP-1) yang dapat menurunkan *Transforming Growth Factor-B* (TGF-B) yang memiliki peran dalam mentranskripsi gen kolagen (Suryani *et.al* 2015).

Meningkatnya transkripsi dan aktivitas pada AP-1 dapat mengganggu kolagen dermal utama I dan III karena efeknya dapat menghambat TGF-B dan secara negatif mengatur proliferasi keratinosit. Aktivasi AP-1 juga dirangsang boleh inhibisi PTEN, fosfatase dan aktivasi Akt yaitu sebuah kinase yang menginduksi sinar UV. Efek dari keduanya memediasi dengan mengaktifkan jalur pensinyalan fosphoinositide 3-kinase. AP-1 juga dapat diinduksi oleh protein 61 sistein (CYR61) dengan mengatur sintesis kolagen yang dapat diinduksi oleh penyinaran UV pada fibroblas. CYR61 ini dapat memicu sintesis enzim yang mendegradasi komponen matriks ekstraseluler seperti matriks metaloproteinase (MMP)-1. CYR61 ini juga dapat menurunkan produksi prokolagen tipe I dan dapat menurunkan regulasi TGF-B tingkat reseptor. Yang akhirnya dengan menginduksi AP-1, CYR61 dapat meningkatkan level dan aktivitas dari MMP, khususnya MMP-1, MMP-3 (stromelysin-1) dan MMP-9 (Yaar & Gilchrist, 2007) (Yaar & Gilchrist, 2007).

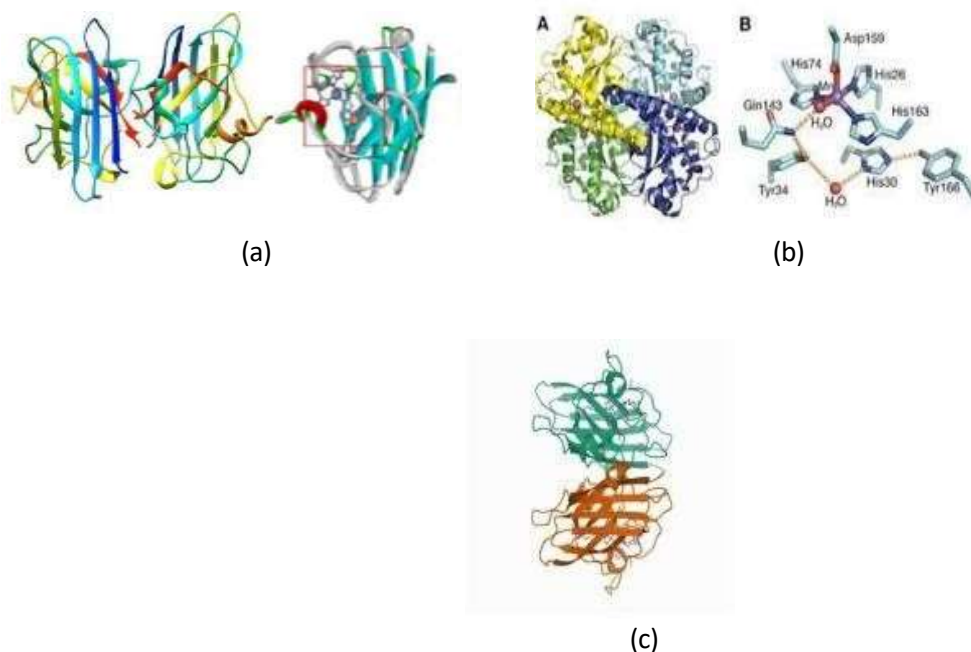
II.3 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida yaitu suatu radikal bebas pada molekul dengan electron tak berpasangan maka memiliki oksigen yang reaktif dan reaktivitasnya ini dapat memberikan efek negat pada tubuh (Nurhayati et al., 2011). SOD (*superoksida dismutase*) merupakan enzim yang dapat diproduksi sebagai sistem pertahanan tubuh pada garis terdepan yang memiliki fungsi untuk mengkatalis dismutase anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen.



Gambar II. 1 Reaksi SOD

Enzim SOD ini merupakan metaloenzim yang dapat mengkatalis dismutase dari radikal superoksida. SOD memiliki ketahanan terhadap panas karena enzim ini memiliki kelebihan dengan sifat spesifik dalam mengkatalis radikal superoksida menjadi oksigen dan peroksidase. SOD ini memiliki kemampuan untuk dapat mengeliminasi radikal bebas dalam jumlah berlebih. Enzim ini juga memiliki sifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada keadaan basa, dan memiliki aktivitas hingga 5 tahun jika disimpan pada suhu 5°C. SOD ini dapat diklasifikasikan menjadi 4 tipe berdasarkan kofaktor logamnya yaitu Cu, Zn, Fe, dan Mn. Sedangkan untuk klasifikasi SOD ada Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/ZnSOD dan EC-SOD.



Gambar II. 2 Struktur SOD, a. Struktur 3D Cu/ZnSOD, b. Struktur 3D MnSOD, c. Struktur 3D ECSOD

II.3.1 Mangan (Mn-SOD)

Merupakan antioksidan endogen yang dapat menguraikan dan menangkap radikal bebas yang

ada didalam sel lalu menjadikan zat yang kurang reaktif. Kerusakan lipid merupakan penyebab dari stress oksidatif yang dapat dideteksi dengan peningkatan kadar Malondialdehyde (MDA) dalam sel. Kofaktor ini merupakan tetramer yang dapat disintesis dan mengandung mangan yang terdapat di mitokondria.

II.3.2 Tembaga-seng (Cu/Zn-SOD)

Merupakan antioksidan yang memiliki fungsi untuk mengkatalis superoksida menjadi hidrogen peroksida. Kofaktor ini termasuk kedalam enzim pertama yang dapat dikarakteristik dan merupakan homodimer yang memiliki kandungan tembaga dan seng yang dapat ditemukan pada sitoplasma. Enzim ini memiliki peranan dalam pensinyalan oksidatif sebagai respon terhadap peningkatan ROS yang dimana kofaktor ini akan cepat berpindah ke nucleus untuk menjaga kestabilan genom.

II.4 EC-SOD

Merupakan tetramer yang memiliki kandungan tembaga dan seng, dan mengandung peptide sinyal untuk mengarahkan ke ekstraseluler. Peranan dari enzim ini yaitu untuk melindungi sel dari stress oksidatif pada permukaan sel nya (Simanjuntak & Zulham, 2020).

Ada beberapa mikroorganisme yang dapat menghasilkan SOD yaitu *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, dan sebagainya (Liyonawati., 2013). Menurut penelitian yang sebelumnya telah dilakukan SOD memiliki nilai aktivitas enzim pada ekstrak buah merah sebesar 420 U/mL pengukuran menggunakan metode SDS-PAGE dengan kestabilan suhu enzim lima hari pada suhu 2–8°C dan 1 bulan pada suhu -70°C dan pH 7,5 (Rahman *et.al* 2012b).

II.5 SOD *Escherichia coli*

Pada sebagian besar bakteri *E.coli* ini tidak termasuk kedalam bakteri yang berbahaya, dan dapat menguntungkan manusia dengan menghasilkan vitamin K lalu dapat mencegah pertumbuhan bakteri lain pada usus. Selain keuntungan tersebut *E.coli* juga dapat dijadikan sebagai teknologi rekayasa genetika yang digunakan sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang akan dikembangkan.

Bakteri *E.coli* dapat menghasilkan SOD ,dengan jenis SOD yang dihasilkan yaitu Cu/Zn-SOD dan Mn-SOD. Enzim Cu/ZnSOD terdiri dari dua sub unit yang cukup identik, memiliki peran sebagai pelindung sel dari radikal superoksida lalu akan ditemukan pada *E.coli* dengan konsentrasi tinggi, pada enzim Cu/ZnSOD akan ditemukan pada bagian membrane sel tepatnya pada periplasma. Sedangkan enzim Mn-SOD termasuk kedalam jenis homotetramer yang terdiri dari satu atom mangan pada setiap sub unitnya dan akan ditemukan pada bagian membrane sitoplasma. Pada penelitian sebelumnya SOD pada *E.coli* ini digunakan sebagai sumber untuk biosensor antioksidan.

Menurut penelitian sebelumnya mekanisme pengukuran kapasitas antioksidan pada biosensor antioksidan dengan melalui reaksi redoks, maka SOD akan mengoksidasi radikal superoksida ($*O_2^-$) berasal dari substrat xantina menjadi O_2 dan H_2O_2 . Selain itu, *E.coli* juga memiliki beberapa struktur antigen:

- a. Antigen O (somatik) memiliki sifat tahan panas atau termostabil yang terdiri dari lipopolisakarida yang mengandung glukosamin dan terdapat pada dinding sel bakteri gram negative.
- b. Antigen K (kapsul) / *envelop antigen* ini terdapat pada permukaan luar bakteri, yang terdiri dari polisakarida yang memiliki sifat tidak tahan terhadap panas (Satish, 1990)
- c. Antigen H (flagel), pada antigen ini bakteri memiliki sifat tidak tahan terhadap panas atau termolabil dan akan rusak pada suhu $100^{\circ}C$

Pada penelitian yang sebelumnya telah dilakukan didapatkan hasil pengaruh substrat xantina terhadap aktivitas antioksidan *E.coli* yang dimobilisasi zeolite alam yang dilakukan dengan rentang konsentrasi 0,1-1,0mM (interval 0,1mM), pH 7 , zeolite 30mg dengan suhu $28^{\circ}C$. parameter kinetika yang akan digunakan yaitu Michaelis-Menten(K_M *app*) dan laju reaksi maksimum nyata (V_{maks} *app*) yang dianalogikan sebagai maksimum nyata(I_{maks} *app*). Nilai K_M *app* yaitu suatu ukuran lemah atau kuatnya enzim yang mengikat substrat, sedangkan I_{maks} *app* yaitu indikator aktivitas daripada enzimnya jika semakin tinggi nilai I_{maks} *app* maka semakin tinggi aktivitas enzimnya. Nilai K_M *app* SOD dari ekstrak *E.coli* adalah 1.1376mM (terimobilisasi) dan 2.4039 mM (tanpa imobilisasi). Nilai I_{maks} *app* ekstrak *E.coli* adalah 2.3770 μA (terimobilisasi) dan 2.5012 μA (tanpa imobilisasi) (Liyonawati, 2013).

II.6 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri merupakan salah satu proses pengambilan bakteri dari lingkungan asalnya lalu ditumbuhkan pada media buatan sehingga akan diperoleh biakan yang murni, teknik pemisahan

ini disertai dengan pemurnian. Isolasi bakteri memiliki prinsip yaitu memisahkan satu jenis mikroba satu dengan mikroba lainnya yang berasal dari campuran beberapa bakteri. Isolasi bakteri ini dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media padat, lalu sel-sel pada mikroba akan membentuk koloni sel yang tetap berada pada tempatnya. Ada beberapa metode yang dapat dilakukan, dua diantaranya yang paling sering digunakan yaitu metode cawan tuang dan metode cawan gores. Yang berdasarkan pada prinsip kerjanya yaitu pengenceran, yang dimaksud untuk memperoleh species individu, yang dianggap bahwa setiap koloni dapat terpisah dari satu jenis sel yang dapat diamati.

II.6.1 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri merupakan proses identifikasi secara konvensional yang berdasarkan pada karakter fenotip bakteri seperti pewarnaan Gram, morfologi koloni dan aktivitas enzim yang sering kali tidak bersifat statis dan dapat pula berubah seiring dengan adanya evolusi.

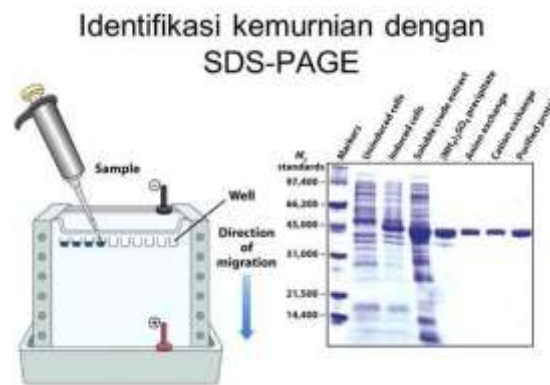
II.7 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan proses pemisahan dengan menggunakan gaya sentrifugal sebagai *diving force*. Pemisahan yang dilakukan terhadap fase pada cair tersuspensi maupun campuran uang berfase cair-cair. Pemisahan dua fase ini dapat dilakukan apabila kedua cairannya mempunyai rapat massa yang berbeda. Komponen campuran ini akan bergerak menjauh dari sumbu sentrifuga dan akan membentuk endapan, lalu menyisakan cairan supernatant yang akan diambil dengan dekantasi (Nasution *et.al* 2012).

II.8 Karakterisasi Enzim

II.8.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis)

SDS page yaitu prosedur dasar yang digunakan untuk menganalisis protein. Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan makromolekul seperti protein, asam nukleat, dan enzim dibawah pengaruh medan listrik. Prinsip kerja dari SDS-PSGE ini melibatkan denaturasi awal protein komponen dengan deterjen anionik yang juga mengikat protein, langkah – langkah ini diikuti dengan elektroforesis melalui akrilamida matriks gel yang memiliki pori dengan memisahkan protein berdasarkan massa molekul (Machsun & Zulaika, 2017).



Gambar II. 3 Instrumen SDS-PAGE

II.9 Suhu Optimal

Suhu optimal merupakan suhu yang tepat untuk suatu reaksi yang menggunakan enzim. Suhu ini memiliki pengaruh terhadap enzimatik. Peningkatan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim, yaitu berubahnya struktur protein pada enzim sehingga dapat menyebabkan penurunan kecepatan reaksi yang mengkatalis enzim tersebut (Kusumaningrum *et.al* 2019). Untuk suhu optimum pada *E.coli* 7-37°C.

II.10 pH Optimal

pH optimum merupakan aktivitas enzim yang dimana aktivitas tersebut mencapai nilai tertinggi, pada pH ekstrim dari pH optimum, baik pH asam maupun pH basa aktivitas enzim sangat rendah kecepatan reaksinya pun akan menjadi lambat. Pada penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim. Penentuan pH bertujuan untuk mengetahui suatu lingkungan atau media buatan tersebut tercapai aktivitas kerja enzimnya secara maksimal sehingga dapat berlangsung secara efisien dan efektif (Kusumadjaja & Rita, 2005). Untuk pH optimum pada *E.coli* 7 - 7,5.

II.11 Purifikasi

Purifikasi enzim merupakan salah satu proses untuk kemurnian enzim. Proses dari purifikasi enzim dilakukan dengan 2 tahapan yaitu pemurnian dengan menggunakan amonium sulfat dalam jumlah besar dan pemurnian dalam jumlah kecil.

II.12 Amonium Sulfat

Amonium sulfat berfungsi untuk mengendapkan protein SOD tanpa ikut mengendapkan protein non SOD. Amonium sulfat ini merupakan garam yang dapat digunakan pada proses pemurnian karena memiliki sifat yang sangat mudah larut dan relatif murah. Prinsip dari pengendapan amonium sulfat ini yaitu salting in dan salting out dengan berkurangnya kelarutan protein karena air dapat diserap oleh garam. Konsentrasi yang digunakan cukup beragam dengan dimulai dari konsentrasi 0-20% garam sudah dapat mengendap. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka kandungan asam amino yang terkandung semakin banyak.

II.13 Dialisis

Dialisis ini merupakan proses untuk memisahkan molekul garam amonium sulfat dan ion – ion yang dapat mengganggu terhadap kestabilan pada molekul protein enzim selama penyimpanan. Pada proses ini menggunakan kantong selofan yang dimana molekul – molekul kecil dengan ion -ion akan melewati pori – pori selaput semipermeabel , untuk menghindari kontaminan maka kantong dialisis tersebut direbus terlebih dahulu selama 10 menit dengan aquadest. Dialisis inidilakukan dengan cara direndam pada kondisi dingin untuk mengurangi terjadinya penurunan aktivitas enzim. Pengadukan dengan kecepatan yang rendah memiliki tujuan untuk memudahkan molekul yang berukuran kecil keluar dari kantong dialisis dan dapat mencegah molekul terkonsentrasi pada sekitar kantong selofan. Pada proses ini tujuannya untukmenghilangkan garam amonium sulfat karena garam ini dapat mengganggu kerja enzim, keberadaan amonium sulfat ini diuji dengan menambahkan BaCl₂ kedalam larutan buffer (Karso et al., 2014).