

# KULIAH 4 – APLIKASI BIOTEKNOLOGI DI KOSMETIK

apt. Shelly Taurhesia, PhD, FACP



THIRD EDITION

## BIOTECHNOLOGY FUNDAMENTALS

Firdos Alam Khan

### Contents

Preface.....	xi
Author.....	xiii

#### Chapter 1 Introduction to Biotechnology..... 1

1.1 What Is Biotechnology?.....	1
1.2 Microbial Biotechnology.....	4
1.3 Animal Biotechnology.....	4
1.4 Plant Biotechnology.....	6
1.5 Nanobiotechnology.....	6
1.6 Environmental Biotechnology.....	6
1.7 Medical Biotechnology.....	8
1.8 Industrial Biotechnology.....	8
1.9 History of Biotechnology.....	9
1.10 Human Genome Project.....	11
1.11 Major Scientific Discoveries in Biotechnology.....	12
1.12 Biotechnology as the Science of Integration.....	13
1.13 Bio-Revolution.....	14
1.14 Future of Biotechnology.....	15

#### Chapter 2 Genes and Genomics..... 19

2.1 Introduction.....	19
2.2 Cell as the Building Block of Life.....	19
2.3 Classification of Cells.....	20
2.4 Extracellular Components.....	22
2.5 Intracellular Components.....	23
2.6 Epigenetics.....	30
2.7 Genes and Genetics.....	31
2.8 Cell Division.....	33
2.9 DNA Replication.....	36
2.10 DNA Interactions with Proteins.....	39
2.11 DNA-Modifying Enzymes.....	40
2.12 DNA Methylation.....	41
2.13 DNA Mutation.....	42
2.14 Polymerase Chain Reaction.....	43

#### Chapter 3 Proteins and Proteomics..... 49

3.1 Introduction.....	49
3.2 Significance of Proteins.....	50
3.3 Protein Biosynthesis.....	54
3.4 Protein Folding.....	59

3.5	Protein Modification.....	61
3.6	Protein Transport.....	62
3.7	Protein Dysfunction and Degradation.....	63
3.8	Regulation of Protein Synthesis.....	64
3.9	Protein Purification.....	67
3.10	Tools of Proteomics.....	67
<b>Chapter 4</b>	<b>Recombinant DNA Technology.....</b>	<b>77</b>
4.1	Introduction.....	77
4.2	Making Recombinant DNA.....	77
4.3	Development of Recombinant DNA Technology.....	79
4.4	Significance of Restriction Enzymes in Recombinant DNA Technology.....	79
4.5	Steps in Gene Cloning.....	82
4.6	PCR and Gene Cloning.....	83
4.7	Significance of Vectors in Recombinant DNA Technology.....	84
4.8	Integration of the DNA Insert into the Vector.....	93
4.9	Introduction of the Recombinant DNA into the Suitable Host.....	95
4.10	Increased Competence of <i>E. coli</i> by CaCl <sub>2</sub> Treatment.....	95
4.11	Infection by Recombinant DNAs Packaged as Virions.....	95
4.12	Selection of Recombinant Clones.....	95
4.13	Identification of Clones Having Recombinant DNAs.....	96
4.14	Selection of Clones Containing a Specific DNA Insert.....	96
4.15	Recombinant DNA Products.....	98
4.16	Advanced Techniques.....	100
<b>Chapter 5</b>	<b>Microbial Biotechnology.....</b>	<b>105</b>
5.1	Introduction.....	105
5.2	Anatomy of Microbes.....	106
5.3	Microbial Metabolism.....	110
5.4	Microbial Cell Culture and Growth.....	114
5.5	Microbial Genetics.....	116
5.6	Genetic Recombination in Bacteria.....	117
5.7	Transposable Genetic Elements.....	122
5.8	Use of <i>E. coli</i> in Microbial Cloning.....	123
5.9	Pathogenic Bacteria.....	124
5.10	Application of Microbes.....	125
5.11	Food Microbiology.....	127
5.12	Microbial Biotechnology.....	130
<b>Chapter 6</b>	<b>Plant Biotechnology.....</b>	<b>133</b>
6.1	Introduction.....	133
6.2	Plant Breeding.....	133
6.3	Applications of Molecular and Genetic Tools in Agriculture.....	143
6.4	Herbicide-Tolerant Plants.....	144

6.5	Pigmentation in Transgenic Plants.....	144
6.6	Altering the Food Content of Plants.....	145
6.7	Gene Transfer Methods in Plants.....	146
6.8	Target Cells for Gene Transformation.....	146
6.9	Vectors for Gene Transfer.....	146
6.10	Transformation Techniques Using <i>Agrobacterium</i> .....	146
6.11	β-Glucuronidase GUS Gene.....	148
6.12	Agroinfection and Gene Transfer.....	148
6.13	DNA-Mediated Gene Transfer.....	149
6.14	Electroporation for Gene Transfer.....	149
6.15	Liposome-Mediated Gene Transfer.....	149
6.16	Gene Transformation Using Pollen.....	150
6.17	Applications of Transgenic Plants.....	150
6.18	How Safe Are Transgenic Plants?.....	153
6.19	Bioengineered Plants.....	153
6.20	Terminator Technology.....	158
<b>Chapter 7</b>	<b>Animal Biotechnology.....</b>	<b>163</b>
7.1	Introduction.....	163
7.2	History of the Use of Animals in Research.....	164
7.3	Drug Testing in Animals Is Mandatory.....	165
7.4	Most Commonly Used Animals in Research.....	165
7.5	Application of Animal Models.....	167
7.6	Animal Models.....	172
7.7	Animal Biotechnology.....	176
7.8	Biotechnology and Fish Farming.....	182
7.9	Regulation of Animal Testing.....	185
<b>Chapter 8</b>	<b>Environmental Biotechnology.....</b>	<b>189</b>
8.1	Introduction.....	189
8.2	Factors Affecting the Environment.....	191
8.3	Environmental Protection by Biotechnology.....	196
<b>Chapter 9</b>	<b>Medical Biotechnology.....</b>	<b>215</b>
9.1	Introduction.....	215
9.2	Vaccines.....	215
9.3	Vaccine Production.....	218
9.4	Large-Scale Production of Vaccines.....	220
9.5	Trends in Vaccine Research.....	221
9.6	Issues Related to Vaccines.....	222
9.7	Synthetic Peptides as Vaccines.....	222
9.8	Antibody Production.....	223
9.9	Gene Therapy.....	226
9.10	Organ Transplant.....	229
9.11	Cloning.....	233
9.12	Human Embryonic Stem Cells.....	233

<b>Chapter 10</b>	<b>Nanobiotechnology.....</b>	<b>239</b>
10.1	Introduction.....	239
10.2	Nanotechnology.....	239
10.3	Nanobiotechnology.....	240
10.4	Applications of Nanobiotechnology.....	241
10.5	Nanoparticles.....	251
10.6	Nanotechnology in the Food Industry.....	252
10.7	Water Pollution and Nanotechnology.....	253
10.8	Research Trends.....	253
<b>Chapter 11</b>	<b>Product Development in Biotechnology.....</b>	<b>257</b>
11.1	Introduction.....	257
11.2	Methods of Scientific Enquiry.....	258
11.3	Commercialization of Scientific Discovery.....	260
11.4	Business Plan.....	260
11.5	Biotechnology Product Development.....	261
11.6	Phases of Biotechnology Product Development.....	266
11.7	Biotechnology Entrepreneurship.....	269
11.8	Capital Investment in Biotechnology.....	270
11.9	Mergers and Acquisitions of Biotechnology Companies.....	271
11.10	Biotechnology Products and Intellectual Property Rights.....	271
11.11	Biotechnology Stock Investment: Pros and Cons.....	275
11.12	Role of Regulators in Biotechnology Product Development.....	276
<b>Chapter 12</b>	<b>Trends in Biotechnology.....</b>	<b>281</b>
12.1	Introduction.....	281
12.2	Forensic Science.....	281
12.3	Regenerative Medicine.....	284
12.4	Bioinformatics.....	288
12.5	Synthetic Biology.....	290
12.6	Biosimilars.....	295
<b>Chapter 13</b>	<b>Industrial Biotechnology.....</b>	<b>305</b>
13.1	Introduction.....	305
13.2	Fermenter or Bioreactor.....	305
13.3	Principle of Fermentation.....	307
13.4	Production of Biomolecules Using Fermenter Technology.....	309
13.5	Development Process of Microbial Products.....	312
13.6	Upstream Bioprocess.....	316
13.7	Downstream Bioprocess.....	319
13.8	Industrial Production of Healthcare Products.....	320
<b>Chapter 14</b>	<b>Ethics in Biotechnology.....</b>	<b>327</b>
14.1	Introduction.....	327
14.2	Genetically Modified Foods and Plants.....	327
14.3	Use of Animals as Experimental Models.....	329
14.4	Use of Humans as Experimental Models.....	332
14.5	Xenotransplantation.....	333

**DEFINISI BIOTEKNOLOGI** adalah bidang yang melibatkan penggunaan sistem biologis atau organisme hidup untuk memproduksi produk atau mengembangkan proses yang akhirnya bermanfaat bagi manusia.

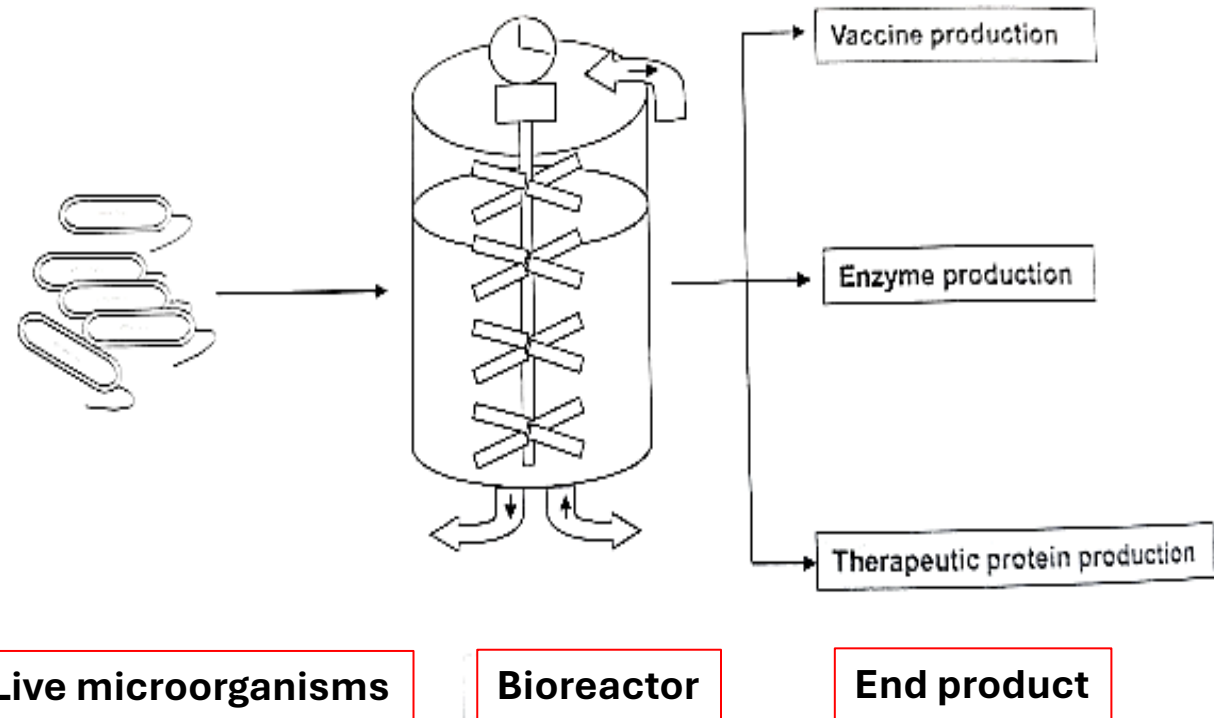
Beberapa definisi bioteknologi yang umum digunakan adalah sbb:

1. Penggunaan organisme hidup (terutama m.o) dalam aplikasi industri, pertanian, medis, dan teknologi lainnya
2. Penerapan prinsip dan praktik rekayasa dan teknologi pada ilmu hayati
3. Penggunaan proses biologis untuk membuat produk
4. Produksi organisme hasil rekayasa genetika atau pembuatan produk dari organisme hasil rekayasa genetika
5. Penggunaan proses seluler dan biomolekuler untuk memecahkan masalah atau membuat produk yang bermanfaat. Suatu proses industri yang melibatkan penggunaan sistem biologis untuk membuat antibodi monoklonal dan protein rekombinan hasil rekayasa genetika
6. Pengembangan organ atau jaringan 3D dalam kondisi in vitro

# BIOTEKNOLOGI INDUSTRI

- Populasi manusia meningkat pesat menyebabkan permintaan produk perawatan Kesehatan meningkat, sehingga diperlukan cara untuk memproduksi dalam jumlah besar (untuk vaksin dan antibiotik). Hal ini dimungkinkan menggunakan **bioreaktor atau fermentor berukuran besar**.
- Bioteknologi industri mencerminkan produksi skala besar, berkaitan dengan semua aspek bisnis yang berhubungan dengan mikrobiologi (Gb.1).

**Mikrobiologi industri** - menggunakan mikroorganisme untuk menghasilkan produk yang diinginkan serta mencegah mikroba agar tidak mengurangi nilai ekonomi berbagai produk. Produk komersial yang dihasilkan mikroba seperti antibiotik, steroid, protein manusia, vaksin, vitamin, asam organik, asam amino, enzim, alkohol, pelarut organik, bahan bakar sintetis.



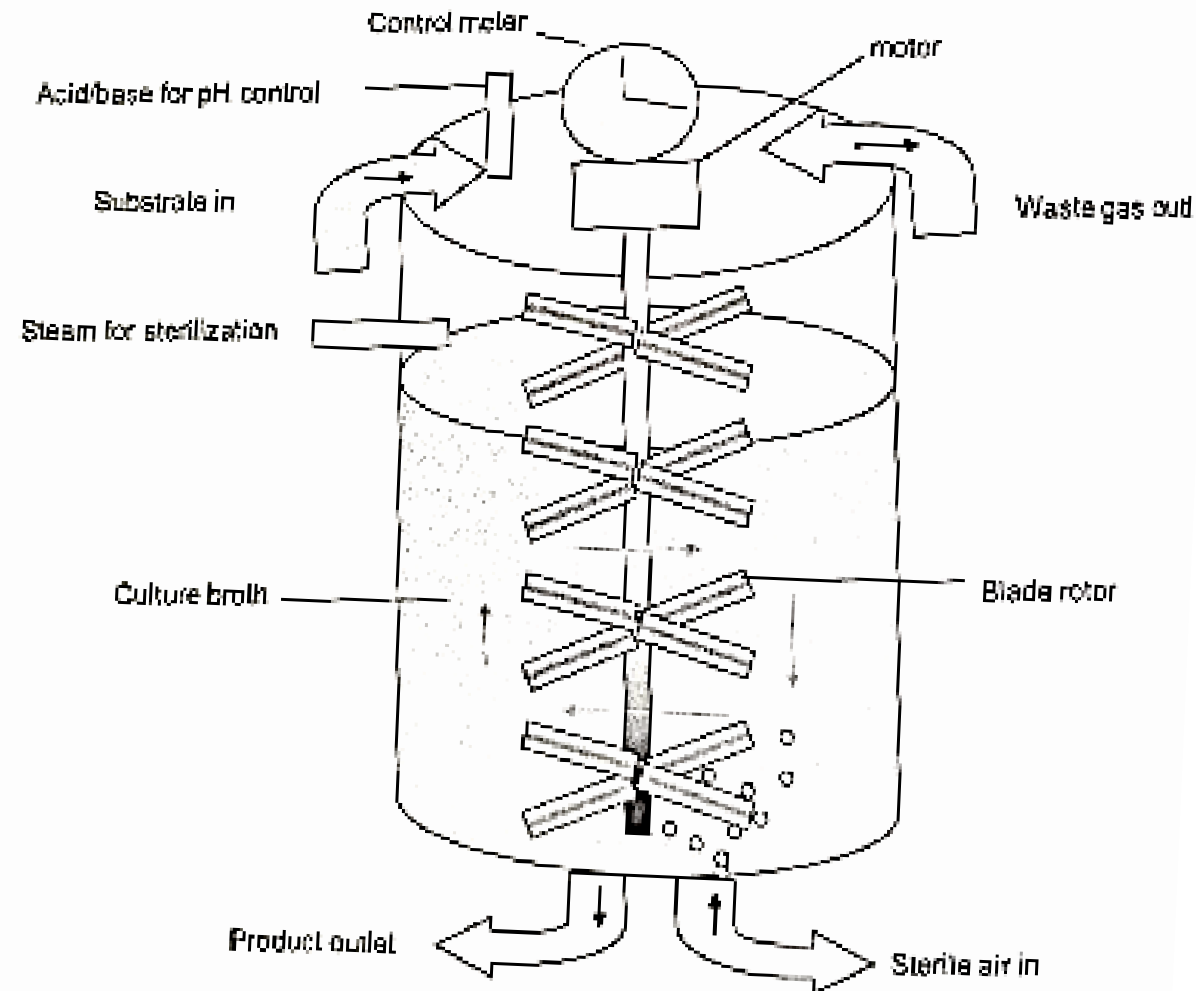
Gb. 1 Aplikasi mikroorganisme hidup dalam pengembangan berbagai produk yang bermanfaat

- **FERMENTASI** memiliki arti luas dalam mikrobiologi industri, mencakup setiap transformasi kimia senyawa organik yang dilakukan menggunakan **mikroba dan enzimnya**. Penggabungan bahan baku (substrat), mikroorganisme (galur spesifik atau enzim mikroba), serta lingkungan yang menguntungkan dan terkontrol (didalam fermentor) menghasilkan zat yang diinginkan.

## **FERMENTOR atau BIOREAKTOR**

- Bioreaktor adalah perangkat yang akan merubah substrat bernilai rendah dengan bantuan sel hidup atau enzim untuk menghasilkan produk bernilai lebih tinggi. Bioreaktor banyak digunakan untuk pengolahan makanan, fermentasi, pengolahan limbah, dll.
- Berdasarkan senyaw yang dipakai, Bioreaktor dibagi menjadi **2 KELAS** : (1) **berbasis sel hidup** dan (2) yang **menggunakan enzim**. Semua bioreaktor melibatkan sistem heterogen yang memiliki **dua atau lebih fase** (cair, gas, padat), sehingga fermentasi membutuhkan kondisi optimal untuk transfer massa, panas, dan momentum yang efisien dari satu fase ke fase lainnya.
- Fungsi yang dimiliki Bioreaktor : (1) **pengadukan**, untuk mencampur sel dan medium; (2) **aerasi**, pada fermentor aerobik untuk pasokan oksigen; (3) **pengaturan faktor-faktor** seperti suhu, pH, tekanan,

- aerasi, pemberian nutrisi, dan level cairan; (4) **sterilisasi dan pemeliharaan sterilitas**; dan (5) **pengambilan sel/medium** pada fermentor kontinu. Fermentor modern biasanya terintegrasi dengan komputer untuk pemantauan proses dan akuisisi data yang efisien.
- Menurut prosesnya, Bioreaktor dibedakan menjadi 4: **aerobik, anaerobik; padat; dan bioreaktor sel terimobilisasi**. Kapasitas 1,0 sd 500.000 L bahkan hingga 1,2 juta liter. Umumnya, 20-25% volume fermentor dibiarkan kosong tanpa diisi media sebagai *headspace*. Desain fermentor bervariasi, tergantung pada jenis fermentasi yang digunakan (Gambar. 2).



**Gb. 2 Contoh Bioreactor atau Fermentor**

# PRINSIP FERMENTASI

- Secara umum fermentasi adalah konversi karbohidrat seperti gula menjadi asam atau alkohol. Fermentasi, khusus dapat merujuk pada penggunaan *yeast* dalam merubah gula ataupun alcohol atau menggunakan bakteri untuk menghasilkan asam laktat pada makanan tertentu. Fermentasi terjadi secara alami dalam berbagai makanan, dan telah dimanfaatkan sejak ribuan tahun yang lalu. Penggunaan awal fermentasi dalam membuat minuman beralkohol, seperti *mead*, *wine* dan bir, minuman ini ditemukan 7000 SM di Timur Tengah. Kemudian ditemukan fermentasi makanan seperti susu dan beberapa sayuran di Timur Tengah dan China.
- Meskipun prinsip umum fermentasi untuk semua minuman dan makanan Adalah sama, metode yang tepat untuk mencapainya dan hasil akhirnya berbeda. Pengawetan makanan seperti mengawetkan mentimun dengan merendamnya dalam larutan air garam yang telah ditambahkan cuka. Seiring waktu, bakteri menghasilkan asam laktat yang memberikan rasa khas serta membantu mengawetkan makanan. Makanan lain dapat diawetkan hanya dengan membungkusnya dalam garam kering dan membiarkan proses fermentasi alami terjadi.
- Ada dua jenis proses fermentasi: **(1) fermentasi aerobik** dan **(2) fermentasi anaerobik**.

## 1. FERMENTASI AEROBIK.

Ciri utama fermentasi aerobik adalah penyediaan aerasi yang memadai. Jumlah udara yang dibutuhkan per jam sekitar 60 kali volume medium; oleh karena itu, bioreaktor untuk fermentasi aerobik memiliki ketentuan agar pasokan udara steril memadai yang umumnya dihembuskan ke dalam medium. Selain itu, fermentor ini mungkin memiliki mekanisme untuk mengaduk dan mencampur medium dan sel. Fermentor aerobik dapat berupa tipe tangki berpengaduk, di mana pengaduk mekanis yang digerakkan motor disediakan, atau tipe **airlift** (pengangkat udara) yang tidak menggunakan pengaduk mekanis tetapi pengadukan dilakukan oleh gelembung udara yang dihasilkan oleh pasokan udara. Umumnya, bioreaktor ini bertipe tertutup atau *batch*, tetapi reaktor aliran kontinu juga digunakan. Reaktor tersebut menyediakan sumber sel yang berkelanjutan dan juga cocok untuk menghasilkan produk ketika produk dilepaskan ke dalam medium. Ada dua jenis utama proses fermentasi aerobik: **metode submerged/terendam kultur & metode semi padat atau padat.**

## 1.1 Metode Submerged/terendam kultur

Suatu organisme ditumbuhkan dalam media cair yang diaerasi dan diaduk secara intensif dalam tangki besar (fermentor baik dapat berupa tangki terbuka atau tangki tertutup), dapat berupa tipe batch atau tipe kontinu, dan umumnya terbuat dari logam yang tidak korosif atau dilapisi kaca atau terbuat dari kayu. Dalam fermentasi *batch*, organisme ditumbuhkan dalam media kultur yang jumlah diketahui untuk jangka waktu tertentu, setelah itu massa sel dipisahkan dari cairan sebelum diproses lebih lanjut dalam kultur kontinu. Media kultur yang diambil tergantung pada laju pembentukan produk dan masuknya media segar. Sebagian besar industri fermentasi saat ini menggunakan proses terendam untuk produksi produk mikroba.

## 1.2 Semi solid /solid state method

Pada metode ini, media kultur diresapi dalam pembawa seperti ampas tebu, dedak gandum, ampas kentang, dll., dan organisme dibiarkan tumbuh di atasnya. Luas permukaan lebih besar untuk pertumbuhan. Umumnya, produksi zat yang diinginkan dan pemulihannya lebih mudah dan memuaskan. Dalam fermentasi, komposisi media kultur berperan penting dan sangat menentukan tingkat produk akhir. Misal media kultur yang mengandung sukrosa akan menghasilkan asam sitrat yang lebih baik daripada karbohidrat lain oleh *Aspergillus niger*. Faktor penting dalam setiap fermentasi yang harus dioptimalkan: pH, suhu inkubasi, aerasi, serta penggunaan bahan baku yang murah

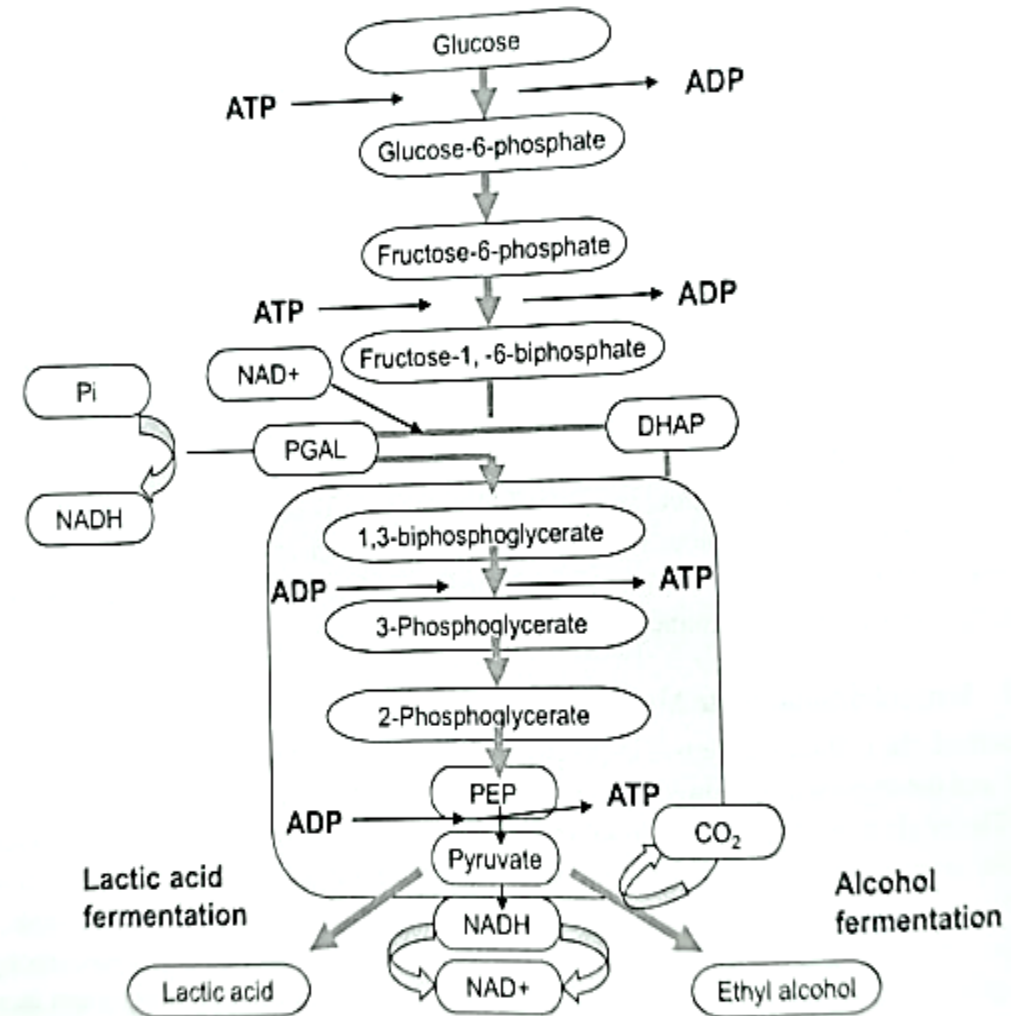
## 2. Fermentasi Anaerobik

- Dalam fermentasi anaerobik, biasanya **tidak diperlukan aerasi**. Namun aerasi dalam beberapa kasus, mungkin diperlukan diawal untuk pembentukan inokulum. Tidak diperlukan alat pengaduk, namun mungkin pengadukan **awal** diperlukan inokulum. Setelah fermentasi dimulai, gas yang dihasilkan dalam proses tersebut menghasilkan pengadukan yang cukup. Udara pada *headspace* fermentor, harus diganti dengan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>), hidrogen (H<sub>2</sub>), nitrogen (N<sub>2</sub>), atau campuran yang sesuai dari ketiganya. Hal ini penting untuk **anaerob obligat** seperti *Clostridium*. Fermentasi biasanya melepaskan CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>, yang dikumpulkan dan digunakan, contoh CO<sub>2</sub> digunakan untuk membuat es kering dan metanol serta untuk gelembung ke dalam fermentor yang baru diinokulasi. Dalam kasus asetogen dan bakteri lain yang memanfaatkan gas CO<sub>2</sub> steril bebas O<sub>2</sub>, atau gas lain dialirkan melalui media.
- Asetogen dikultur dalam fermentor 400 L dengan menggelembungkan CO<sub>2</sub> steril, akan dipanen 3 kg sel, pada setiap percobaan. Fermentor anaerobik tidak memerlukan kondisi anaerobik untuk memulihkan produk. Namun, banyak enzim dari organisme tsb sangat sensitif terhadap O<sub>2</sub>

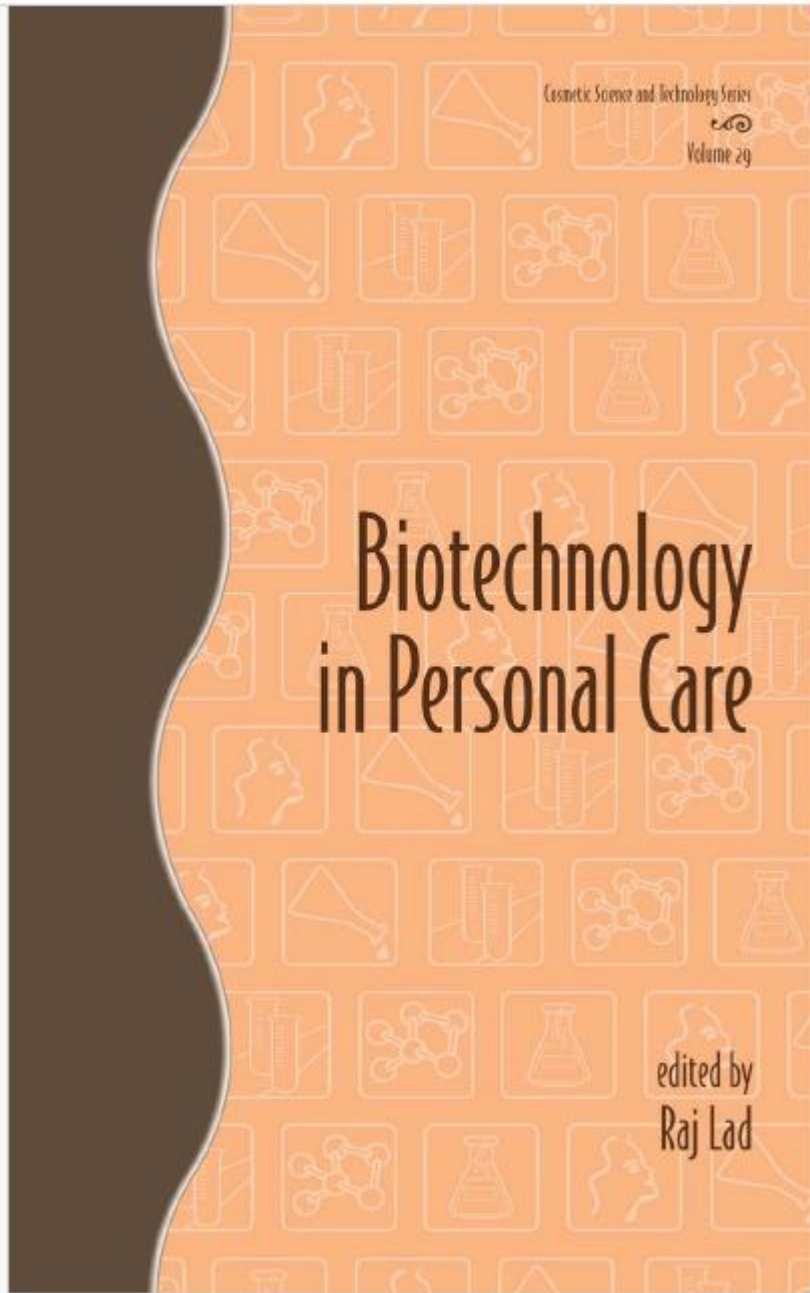
- apabila tujuannya memulihkan enzim, maka sel harus dipanen dalam kondisi anaerobik yang ketat. Dalam kondisi anaerobik, molekul piruvat dapat mengikuti jalur anaerobik lainnya untuk meregenerasi nikotinamida adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) yang diperlukan untuk melanjutkan glikolisis, termasuk fermentasi alkohol dan fermentasi laktat.
- Tanpa adanya oksigen, reduksi lebih lanjut atau penambahan ion  $\text{H}_2$  dan elektron ke molekul piruvat yang dihasilkan selama glikolisis disebut fermentasi. Proses ini mendaur ulang NAD ( $\text{NADH}$ ) yang tereduksi atau terhidrogenasi, menjadi koenzim  $\text{NAD}^+$  bebas, yang berfungsi sebagai penerima  $\text{H}_2$ , dan memungkinkan glikolisis untuk berlanjut. Fermentasi alkohol, yang merupakan ciri khas beberapa tumbuhan dan banyak mikroorganisme, menghasilkan alkohol dan  $\text{CO}_2$  sebagai produknya. Ragi digunakan oleh industri bioteknologi untuk menghasilkan gas  $\text{CO}_2$  yang diperlukan untuk pembuatan roti dan dalam fermentasi hop dan anggur untuk menghasilkan minuman beralkohol. Reduksi piruvat oleh  $\text{NADH}$  untuk melepaskan  $\text{NAD}^+$  yang diperlukan untuk jalur glikolisis dapat menghasilkan fermentasi laktat, yang terjadi di beberapa jaringan hewan dan m.o

- Sel bakteri penghasil asam laktat bertanggung jawab atas pengasaman susu untuk menghasilkan yogurt. Pada sel otot hewan yang bekerja, fermentasi laktat mengikuti aktivitas anaerobik, tetapi asam laktat yang menumpuk di dalam sel akan menyebabkan kelelahan otot dan kram. Unit fermentasi dalam bioteknologi industri analog dengan pabrik kimia dalam industri kimia. Proses fermentasi adalah proses biologis sehingga memiliki persyaratan sterilitas dan penggunaan reaksi enzimatik seluler seperti reaksi kimia yang dibantu oleh katalis non-hidup, terkadang perlu suhu dan tekanan tinggi. Proses fermentasi industri dapat dibagi menjadi 2 jenis utama dengan kombinasi serta modifikasi:

**fermentasi batch & fermentasi kontinu.**



Gb 3. Bioreaktor untuk produksi asam laktat dan alkohol



<b>1. Overview and Fundamentals of Biotechnology . . . . .</b>	<b>1</b>
Hugh C. McDonald and Roopa Ghirnikar	
• Definition and Personal Care Viewpoint . . . . .	1
• Historical Seeds of Biotechnology . . . . .	2
• Tools of Biotechnology . . . . .	10
• Current and Future Products from Biotechnology . . . . .	22
• References . . . . .	24
<b>2. Personal Care Products via Fermentation &amp; Biocatalysis Processes ...</b>	<b>27</b>
Erick J. Vandamme and Wim Soetaert	
• Historical . . . . .	27
• Chemical Synthesis of Cosmetic Ingredients . . . . .	28
• Plant- and Herbal-Derived Personal Care Products . . . . .	28
• Animal-Derived Personal Care Products . . . . .	29
• <b>Microbial Processes &amp; Products for Cosmetic Use: General Aspects</b>	<b>29</b>
• <b>Microbial Products for Skin Care . . . . .</b>	<b>32</b>
• <b>The Clostridium botulinum Toxin for Medical &amp; Cosmetic Use . . . . .</b>	<b>40</b>
• Microbiological Preservatives and “Skin” Prebiotics . . . . .	42
• Microbial Enzymes for Personal Care . . . . .	42

# ALASAN PRODUKSI BAHAN BAKU KOSMETIK SECARA BIOTEKNOLOGI

- Bahan baku hewan - Langka, seperti ambergris (dari sperma ikan paus), musk dari rusa kesturi, castoreum dari berang-berang, adanya kekawatiran tercemar penyakit hewan, BSE
- Bahan baku tumbuhan - banyak factor yang mempengaruhi, seperti perubahan komposisi, fungsi panen, asal usul, prosedur ekstraksi serta sulit diproduksi.
- Sintesa kimia - sintesis sederhana dari fenol, isobutena, dan asam asetat anhidrida, diperoleh butil sikloheksil asetat 4-tercier, suatu komponen dengan bau **kayu/green** yang menyengat. Sebagian besar surfaktan (deterjen) misal pada sampo, diproduksi dengan cara kimia, namun konsumen lebih menyukai yang alami.
- Bioteknologi memanfaatkan kemampuan organisme hidup tertentu untuk menyerap suatu zat dan, melalui proses biologis yang ada, mengubahnya menjadi produk industri yang bermanfaat.
- Sintesis mikrobiologis (fermentasi) diterima konsumen dan dianggap sebagai proses **alami**

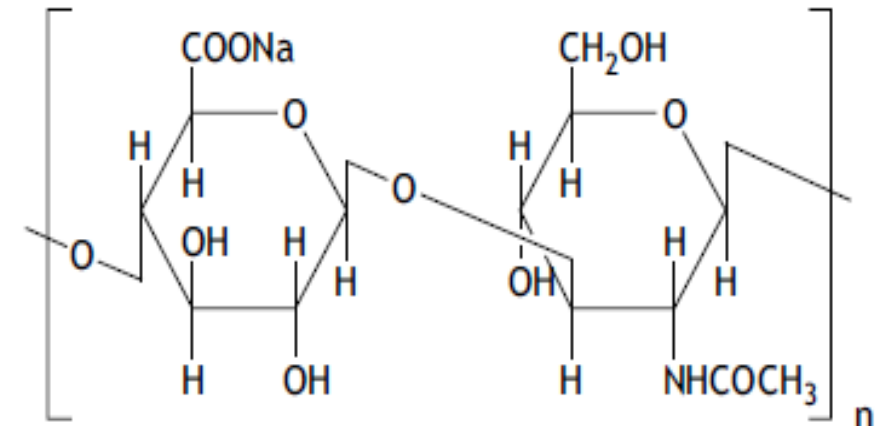
**Tabel 1. Pelembab Kulit yang dihasilkan mikroba**

Product	Producing microorganism or enzyme	Applications in cosmetics
Hyaluronan	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Water retention; Gelling agent; Diffusion of cosmetic ingredients
Poly-(1-4) $\beta$ -D-glucuronan	<i>Rhizobium meliloti</i>	Gelling agent; Water retention; Emulsion stabilization
L-Fucose rich polysaccharide (Fucogel <sup>®</sup> )	<i>Klebsiella sp.</i> , <i>Clavibacter sp.</i>	“Perfect touch”; Water retention; Decreasing allergic response
Chitosan	<i>Mucorales fungi</i>	Skin moisturizing; Film forming on the skin; Anti-Candida activity; Bacteriostatical (skin, hair, and oral hygiene)
Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Stabilization of emulsions and suspensions (toothpaste, etc.) Water retention (ointments, lotions, shampoos) Gelling agent (deodorant gels, etc.)
*PUFAs (g-linolenic acid, GLA)	<i>Mortierella fungi</i>	Water retention; Anti-aging of the skin
Ceramide (sphingolipids)	<i>Pichia cifferri</i> en <i>Candida</i> —yeast fermentation, followed by chemical acylation	High water-retention capacity Against skin scaling Skin moisturizing
Ectoines	<i>Halomonas sp.</i> ; aerobic halophilic eubacteria	Skin moisturizing

\*)PUFAs = Polyunsaturated fatty acids

# 1. Asam Hyaluronat sebagai Pengganti Kulit/Kulit kedua

- Merupakan heteropolimer biasa dari dimer asam glukuronat yang berpasangan  $\beta$ -1,3 dan N-asetilglukosamin, dan digabungkan dengan  $\beta$ -1,4 ke dimer identic (seperti Gbr. 1).
- HA adalah polimer glikosaminoglukan yang sangat viskoelastik yang membentuk bagian dari jaringan ikat pada semua vertebrata, melumasi sendi dan bertindak sebagai “*shock absorber*”
- **Struktur HA** murni akan **identic** meskipun berasal dari mana pun. Berat molekulnya dapat bervariasi tergantung pada sumber dan prosedur isolasi. Aplikasinya tergantung BM
- Semakin tinggi BM nya semakin baik dan mahal harganya. HA perlu diekstraksi dan dimurnikan menjadi fraksi non-imunogenik dan non-inflamasi dari jengger, kulit hiu, dan tali pusar.
- Tahun 1982, Perusahaan yang pertama kali menerapkan HA hewani dalam kosmetik adalah **Estée Lauder**. Namun, HA dapat diproduksi melalui fermentasi karena HA merupakan **komponen pada kapsul** yang ada pada bakteri *Streptococcus* tertentu (Lancefield grup A atau C).



Gb 1. Struktur asam hyaluronat

- Sejak tahun 1985, Shiseido Co memproduksi HA melalui fermentasi dengan bakteri pembentuk kapsul *Streptococcus zooepidemicus*.
- Novozymes memproduksi HA BM tinggi yang sangat murni, berbiaya rendah dengan memanfaatkan organisme *Bacillus*, bukan dari organisme *Streptococcus* (patogen).
- Garam natrium HA dengan berat molekul 1,1 - 1,6 juta dalton digunakan sebagai bahan salep, losion, dan riasan untuk perawatan kulit : melindungi dan melumasi sel, membantu pengangkutan molekul tertentu, dan mengontrol retensi kelembapan.
- Saat ini HA dipasarkan oleh Biomatrix (USA), Bio-Technology General (Israel), Diagnostic Inc. (USA), Fermentech (U.K.), Genzyme (USA), Kibun Food Chemifar Co. (USA), Med. kimia. Products (AS), Pharmacia (Swedia), dan Shiseido Co. (Jepang).

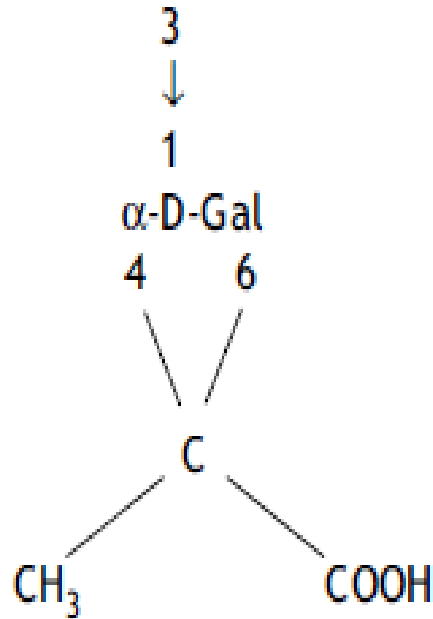


Gb 2. Hyaluronic acid serums like these from Glow Recipe and RoC are recommended to help your skin retain moisture and ward off dryness.

## 2. Fucogel® Pelembab kulit dengan Sentuhan Sempurna

Bahan polisakarida kapsul berlendir, yang kaya akan L-fucose yang langka dan diproduksi oleh bakteri seperti *Klebsiella sp.* dan *Clavibacter sp.*, merupakan **pelembab kulit** yang efisien (Struktur seperti dalam Gb 3). Film akan memberikan “**psikosensori**” yang sempurna dan menurunkan respons alergi. Dipasar dikenal dengan nama dagang **FUCOGEL**

→3)-β-D-Glcp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→

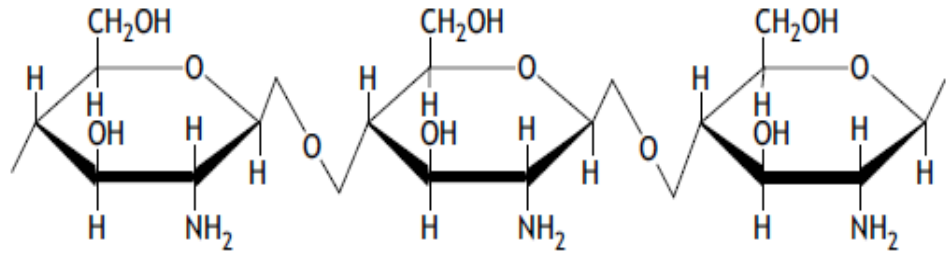


Gb. 3 Struktur *repeating unit* polisakarida kapsular dari *Clavibacter sp*

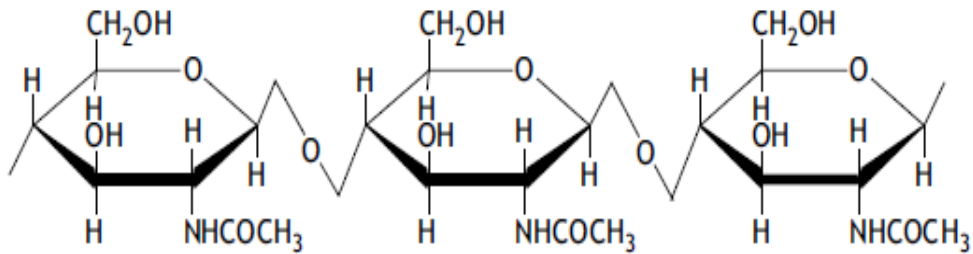
### Calming Night Cream

	INGREDIENTS	INCI NAME	%
A	EMULIUM MELLIFERA (GATTEFOSSÉ)	<i>Polyglyceryl-6 distearate / Jojoba esters / Polyglyceryl-3 beeswax / Cetyl alcohol</i>	4.00
	AXOL C62 (EVONIK)	<i>Glyceryl stearate citrate</i>	0.30
	SONNENATURAL (SONNEBORN)	<i>Olus oil</i>	3.00
	NACOL 16 98 (SASOL)	<i>Cetyl alcohol</i>	2.00
	DUB MCT (STÉARINERIE DUBOIS)	<i>Caprylic / capric triglyceride</i>	5.00
	ISOVOL 20 (SASOL)	<i>Octyldodecanol</i>	5.00
B	DEMINEALIZED WATER	<i>Aqua</i>	Qsp 100
	PRESERVATIVE	/	Qsp
	<b>FUCOGEL® POWDER (SOLABIA GROUP)</b>	<b><i>Maltodextrine / Biosaccharide gum-1</i></b>	<b>0.30</b>
	GLYCERIN	<i>Glycerin</i>	4.00
	ACTIGUM VSX 20 (CARGILL)	<i>Sclerotium gum / Xanthan gum</i>	0.30
C	RHAMNOSOFT® HP NAT (SOLABIA GROUP)	<i>Biosaccharide gum-2</i>	3.00

### 3. Kitosan sebagai Pelembab & Biofilm



Chitosan



Chitin

Gb 4. Struktur Kitosan dan Kitin

- **Kitosan** adalah bentuk kitin ter deasetilasi (Gbr. 4).
- Kitin adalah polimer  $\beta$ -1,4 dari N-asetil glukosamin, yang ditemukan di dinding sel jamur Mucorales (*Mucor mucedo*, *Rhizomucor miehei*, *Absidia coerulea*), serta kerangka luar krustasea, krill, dan serangga.
- Pemberian oral menurunkan kolesterol dan mengurangi lemak. Kitosan dapat digunakan sebagai senyawa penyembuh luka, antitumor, dan sebagai imunoadjuvan. Sebagai bahan enkapsulasi untuk biosida, benih, pupuk, dan pertanian lainnya, juga sebagai flokulan dalam penjernihan air.
- Turunan N-karboksimetilkitosan mempunyai kegunaan sebagai **zat pengkelat, pelembab kulit, pembentuk lapisan transparan, penstabil emulsi**.
- Produsen: Cognis (Jerman), Dainichiseika Color & Chem. Co. (Jepang), Amerchol Corp (AS), American Cyanamid (USA), Protan (Belanda), Kyowa Oil & Fat Co. Ltd. (Jepang), Novachem Ltd. (Kanada), dll.

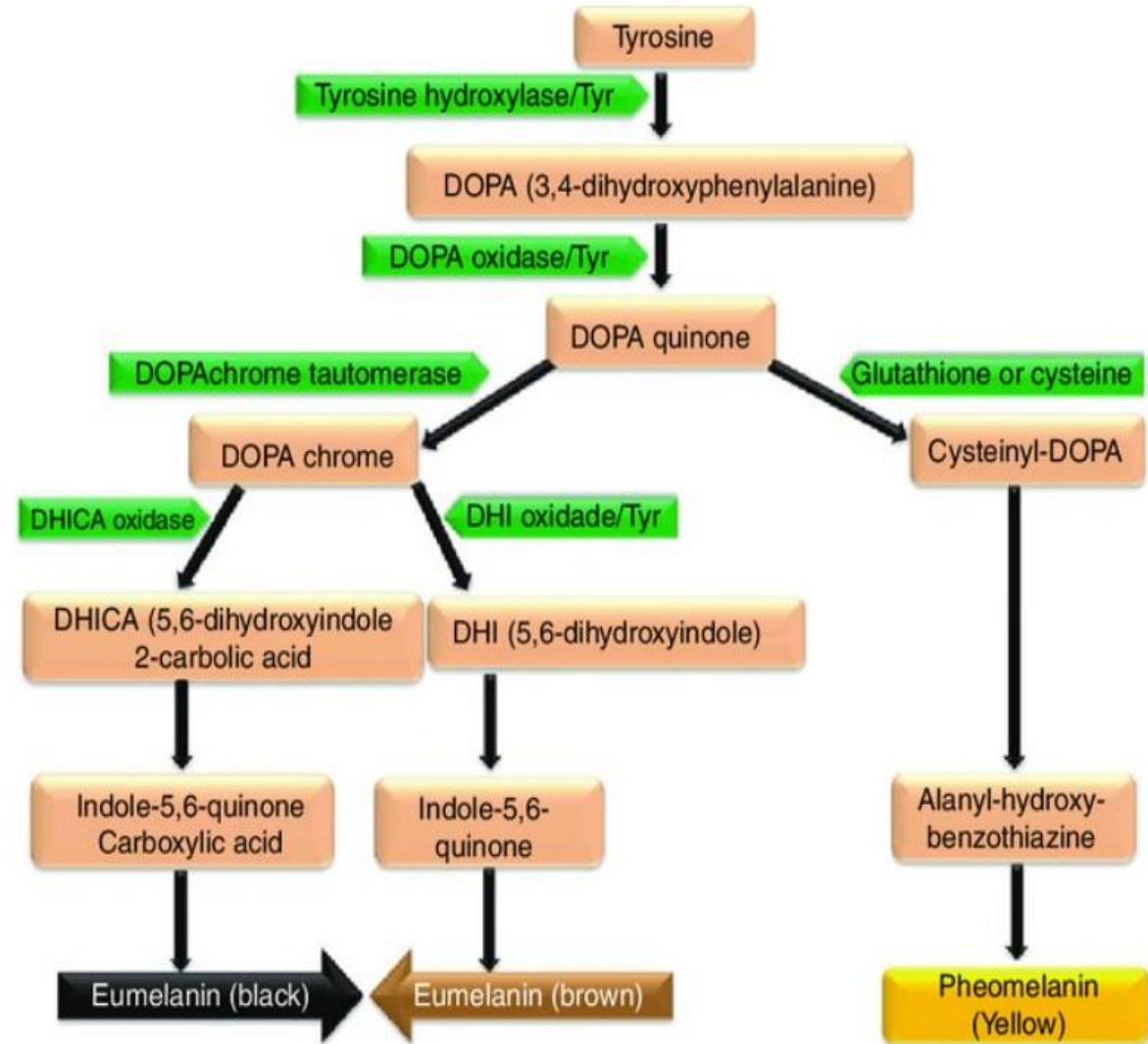
**Tabel 2. Bahan *tanning* & *antiaging* yang dihasilkan mikroba**

Product	Producing microorganism or enzyme	Applications in cosmetics
Dihydroxyacetone	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Self-tanning products
Malytyrosine, tyrosineglucosinate	<i>Micrococcus caseolyticus protease</i>	“Quick-tanning” molecule; Soluble melanin precursor
Urocanic acid	<i>Achromobacter liquidum ammonialyase</i>	Protecting agent against UV-B radiation
(Pro)vitamins (D-panthenol, niacine, vitamin E, vit. C, $\beta$ -carotene, PUFAs)	<i>Various bacteria and fungi</i>	Against skin aging; Antioxidant
Ubiquinone (coenzyme Q10)	<i>Saccharomyces yeast</i>	Antiwrinkle effect
Amino acids ( <b>SER, ASP, GLU, OH-PRO</b> ) (+sorbitol, lactic acid)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Moisturizing effect; Cell growth stimulation Natural moisturizing factor (NMF)–effect
Yeast glucan derivatives (carboxymethyl-poly $\beta$ (1,3) glucan)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , other yeasts (Tremella sp., etc.)	Skin protecting; Immunostimulant
Kojic acid	<i>Aspergillus sp.</i>	Skin lightening
$\alpha$ -Arbutin	Enzymatic glucosylation of hydroquinone ( <i>Bacillus sp.</i> , <i>Leuconostyoc sp.</i> , <i>Xanthomonas sp.</i> , etc.)	Treatment of age spots
Hydroxyguaiacol	Fungi, yeast ( from ferulic acid)	Antioxidant; Suncare
Caffeic acid esters	Enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid (in sunflower seed meal)	UV-A and UV-B absorbers. Ethylhexylester is a liquid product, facilitating formulation
(Allo)Melanins	Enzymatic polymerization (polyphenoloxidase) of caffeic acid	UV-absorbers; Antioxidant; Skin pigmentation

**Singkatan** : ASP, aspartic acid; GLU, glutamic acid; OH-PRO, hydroxyproline; SER, serine; UV, ultraviolet.

## 4. SKIN DEPIGMENTATION (PENGHILANG PIGMEN PADA KULIT)

- Pigmentasi merupakan hasil sintesis dan distribusi pigmen melanin pada kulit.
- Masyarakat Barat menyenangi berjemur untuk mendapatkan warna coklat. Paparan berlebihan terhadap sinar UV dan bahan kimia tertentu menyebabkan **peroksidasi kulit**, menyebabkan kerusakan sel epidermis, dan **hiperpigmentasi**.
- Orang Asia cenderung menyukai kulit yang lebih putih, dan sebagian orang barat ingin “menyembunyikan” bintik hitamnya, maka dikembangkan produk pencerah berdasarkan hambatan pada tyrosinase, diantaranya arbutin, luteolin, asam kojic, dsb.
- Asam kojat dan alfa-arbutin sudah dapat diproduksi melalui Fermentasi dan proses biokatalitik



Gb 5. Biosintesa Melanin

## 5. RACUN *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* DALAM KOSMETIK

- **Botox** adalah protein racun yang dihasilkan oleh bakteri tanah anaerobik yang membentuk endospora *Clostridium botulinum* merupakan molekul yang paling beracun.
- Species ini ditemukan oleh **Prof. E. Van Ermengem** pada tahun 1895, ahli mikrobiologi di Universitas Ghent, Belgia.
- Kompleks toksin *Clostridium botulinum* terdiri dari **neurotoksin** dan **protein** penstabil. Neurotoksin tidak tahan panas, merupakan protein yang mengandung sekitar 1.300 asam amino dan terdiri dari dua rantai protein yang dihubungkan melalui jembatan sistein.
- Ada 7 serotipe antigenik (A sampai G). Dosis LD50 adalah **satu nanogram per kg berat badan**. Keracunan botulisme dapat terjadi akibat mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi bakteri/racun tsb. Racun bermigrasi ke otot dan saraf, dan akan **menghambat pelepasan neurotransmitter asetilkolin (ACh)** secara permanen, mengakibatkan melemahnya otot, pusing, kesulitan bernapas, kelumpuhan, dan akhirnya

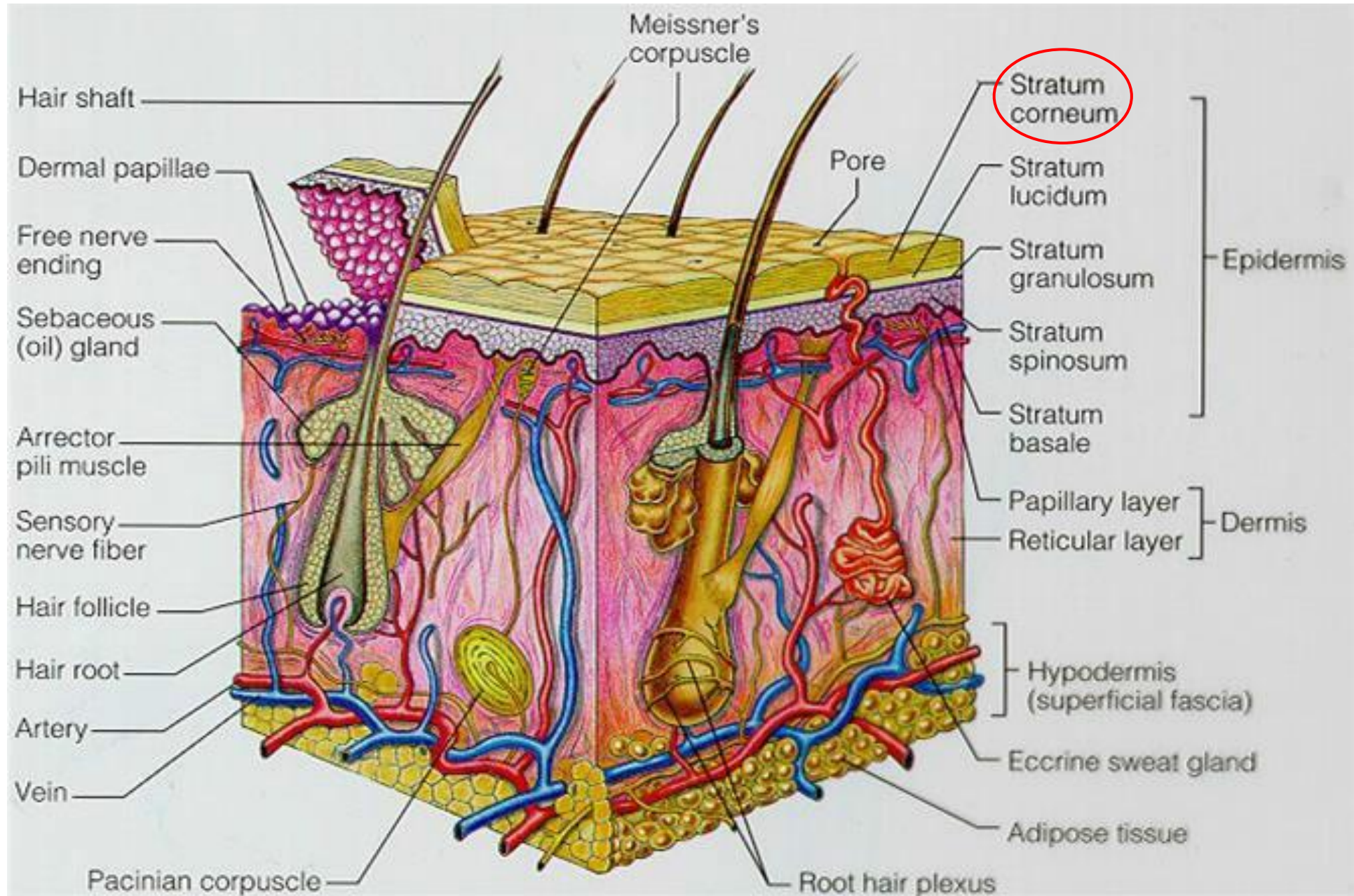
- kematian. Pada tahun 1930-an, botulisme menjadi fenomena yang sangat ditakuti, misalnya pada produksi makanan kaleng yang **tidak** disiapkan secara optimal.
- Pada suhu 85°C, setelah 15 menit toksin menjadi tidak aktif, namun endospora *Clostridium* dapat bertahan terhadap panas; dan dalam keadaan anaerobic akan berubah dengan cepat menjadi sel yang tumbuh aktif dan mengeluarkan toksin.
- **Manusia dapat terkontaminasi juga** melalui infeksi luka atau melalui pertumbuhan bakteri penghasil racun di usus secara in vivo.
- Hewan dapat mati karena botulisme, misalnya burung air, pada waktu air kekurangan oksigen akibat adanya mikroorganisme aerobik (pemakan oksigen, seperti bakteri, alga, dll). *Clostridium botulinum* jenis A & B hidup pada manusia, sedangkan C & D pada sapi.
- Kekawatiran dan ketidakpastian terhadap botulisme meningkat. Pada tahun 2002, di sebuah peternakan sapi perah di Inggris ada 164 ekor sapi terkontaminasi, dan dalam waktu dua minggu 141 ekor sapi mati. Semua gejala menunjukkan bahwa penyebabnya adalah botulisme, namun tidak jelas sumber kontaminasi (air minum, pakan, silase, dll.) dan neurotoksin *Clostridium*.

- **Penggunaan “botox”** dalam dosis yang sangat rendah, untuk pengobatan **dystonia** (= kontraksi otot yang tidak disengaja dan tidak diinginkan pada manusia/ hewan).
- Tahun 1973, Dr. E.J. Schantz (Univ of Wisconsin, Madison, USA) bekerja sama dengan Dr. Scott (dokter mata dari San Francisco, California) menguji botox untuk mengobati **strabismus** (mata juling, mata malas), **blepharospasm** (kelopak mata tertutup) serta kejang hemifasial lainnya.
- Tahun 1989, US FDA mengizinkan penggunaan toksin bakteri dalam dosis **nanogram**
- Saat ini, botox digunakan untuk menyembuhkan **distonia fokal** di sekitar leher, tulang rahang, pita suara, siku (tenis), dsb atau untuk menghentikan kegagapan dan migrain.
- Penyuntikan secara berulang, beberapa pasien dapat membuat antibody sehingga efeknya hilang.
- Toksin botoks diproduksi melalui proses fermentasi dengan strain *Clostridium botulinum* yang sesuai (tipe A diproduksi oleh strain “Hall”).
- *Clostridium botulinum* menghasilkan endospora dan bersifat anaerobic. Pertumbuhan terbaik pada suhu 35°C pada glukosa, hidrolisat protein, dan ekstrak ragi dalam atmosfer nitrogen.
- Fermentor khusus dengan insinerator untuk membuang gas, kontrol terhadap pH, kecepatan pengadukan, suhu, gas, dan busa agar diperoleh titer eksotoksin yang tinggi.

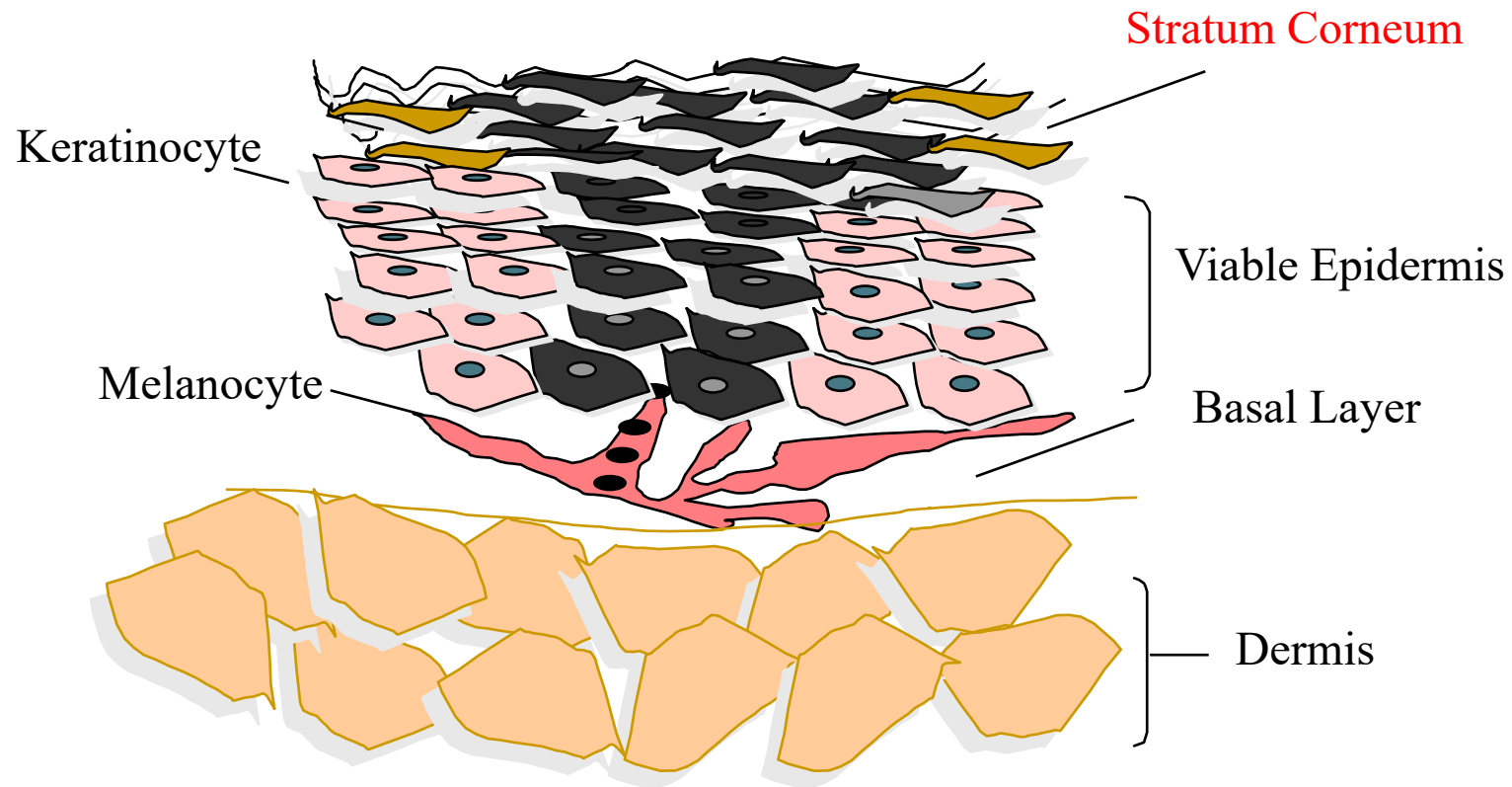
# Biotechnology in Personal Care

edited by  
Raj Lad

<b>5. Biotechnology in Skin Care (I): Overview</b> .....	117
• Skin Structure, Properties, and Physiology .....	117
• Recombinant DNA Technology: The Impact on Skin Structure and Function .....	122
• How Will Biotechnology Impact Skin Care in Future? . . .	126
• Personalized Skin Care: Is It a Dream or Reality? . . .	128
• References . . .	130
<b>6. Biotechnology in Skin Care (II): Moisturization</b> . . .	133
• Introduction . . .	133
• Skin Structure & Functions Involved in Moisturization . . .	133
• Evolution of Biotechnology for Skin Moisturization .....	135
• New Aspects to Regulate the Water Balance in the Skin and Develop New Products Using Biotechnology . . .	139
• Bioinformatics for Understanding and Predicting Skin Phenotypes After External Stimulation or During Aging . . .	148
• References.....	154
<b>7. Biotechnology in Skin Care (III): Skin Aging</b> . . . . .	163
• Introduction .....	163
• Processes of Skin Aging . . .	164
• What will Biotechnology Deliver in Terms of Target Identification.....	174
• Skin Anti-Aging Technologies . . .	175
• Sphingolipids . . .	185
• Conclusions . . .	193
• References . . .	193



- *Stratum corneum* sangat tipis ( $< 20 \mu\text{m}$ ), dapat mencegah TEWL (kehilangan air melalui epidermis) dan melindungi tubuh dari berbagai rangsangan fisik, kimia, dan biologis dari luar kulit.
- SC terdiri dari **10 hingga 20 lapisan** sel kornifikasi (**korneosit**), sebagian besar matang dan mengalami keratinisasi, berasal dari diferensiasi terminal keratinosit yang dibuat di dasar epidermis.



- Kandungan air pada SC mempengaruhi penampilan dan sifat fisik kulit seperti kekenyalan & fleksibilitas
- Korneosit meretensi air yang ada di dalam sel melalui aksi *Natural Moisturising Factor* (NMF).
- NMF terdiri dari asam amino, ion, asam laktat, urea, & bahan lain
- Komponen NMF dihasilkan dari **pemecahan filaggrin** yang dibentuk dari pro-filaggrin selama diferensiasi terminal keratinosit

Fungsi protektif dan retensi SC dicapai melalui pengaturan sel-sel berlapis yang ketat, dikenal sebagai struktur "**brick and mortar**" (Gambar 1).

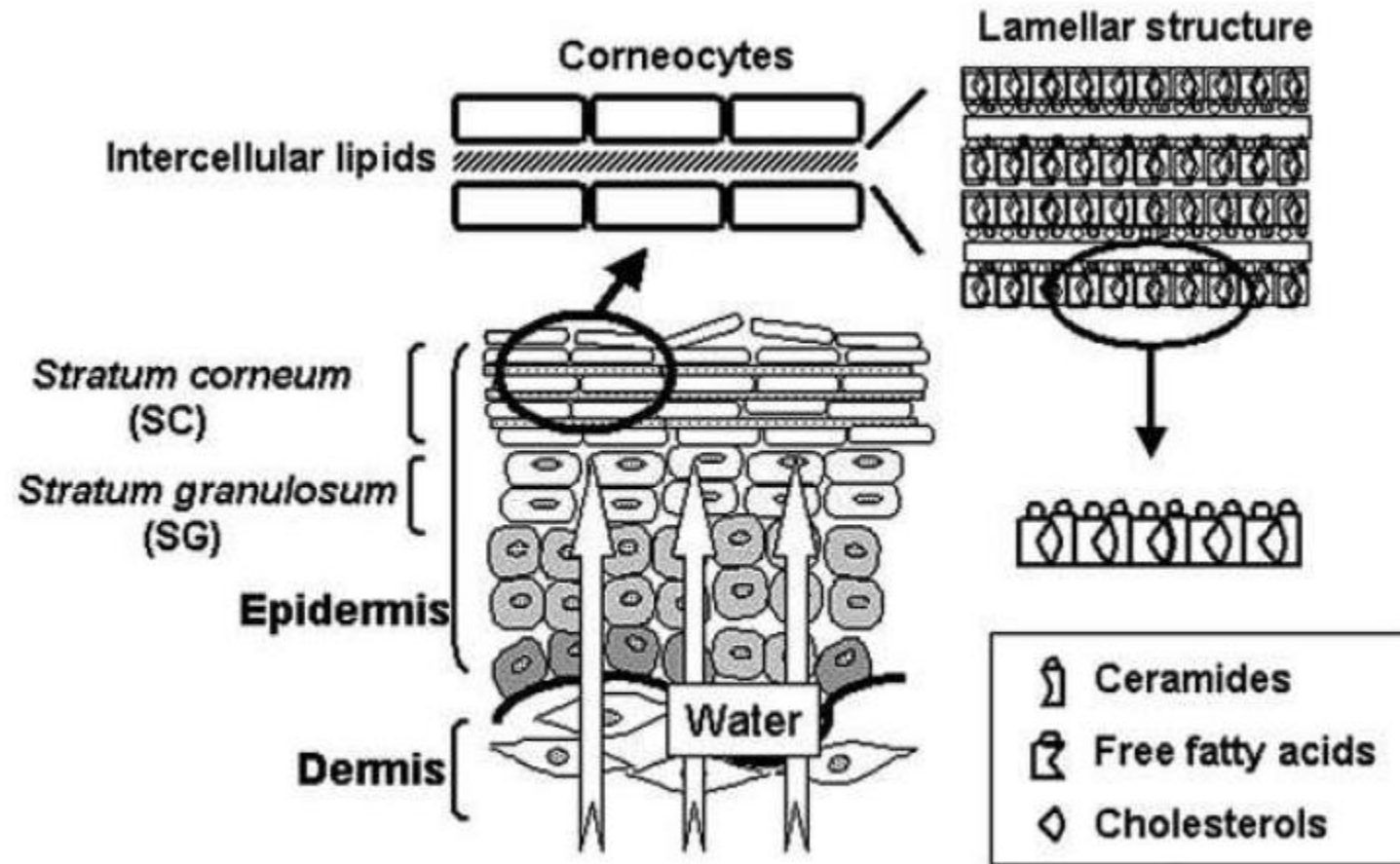
- Pro-filaggrin disintesis dan dikumpulkan dalam butiran keratohyalin pada lapisan granular.
- Filaggrin yang diproses mengikat filamen keratin untuk membentuk **matriks struktural di SC**, yang kemudian akan terdegradasi sepenuhnya di lapisan atas SC .
- Komposisi asam amino NMF konsisten dengan urutan DNA pro-filaggrin.
- Sebum terdiri dari trigliserida, asam lemak, skualen, ester wax, digliserida, ester kolesterol, & kolesterol. **Sebum** dihasilkan oleh kelenjar sebacea, berperan penting dalam hidrasi kulit.
- Penurunan Lipid di permukaan kulit dapat menyebabkan kulit kering pada orang lanjut usia.

### **Fungsi Penghalang dari Permeabilitas Kulit (*Epidermal Permeability Barrier Function*)**

- Struktur **bata-dan-mortar** amat berperan dalam perlindungan terhadap TEWL.
- Percobaan pada hewan diketahui bahwa gangguan pembentukan SC dengan merusak **gen penting pada diferensiasi keratinosit** dapat mematikan tikus transgenic dan *knockout*
- Lipid interseluler yang membentuk mortar berperan dalam mempertahankan fungsi penghalang dari permeabilitas epidermis.
- **Pelarut organik** yang dapat menghilangkan lipid sehingga meningkatkan TEWL secara dramatis.

## Struktur bata/*brick* & mortar (Gb. 1).

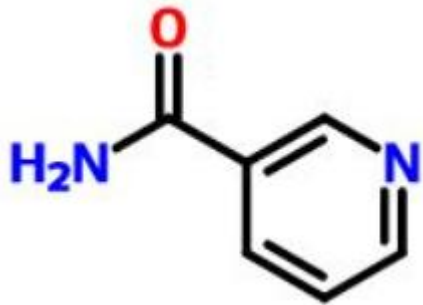
- **Brick/Bata** tersusun dari **korneosit** yang memiliki selubung kornefikasi kaku
- **Mortar** tersusun dari protein khusus dan **lipid interseluler**, seperti **seramida** (40-60%), **asam lemak** (20-30%) dan **kolesterol** (20-30%), yang dikeluarkan dari granula lamelar di *stratum granulosum*.
- Lipid dan air bergabung, membentuk struktur lamelar yang khas.



Gb. 1 Struktur Kulit yang terlibat dalam Pelembab/Moisturizer



# NIASINAMIDA (NA)

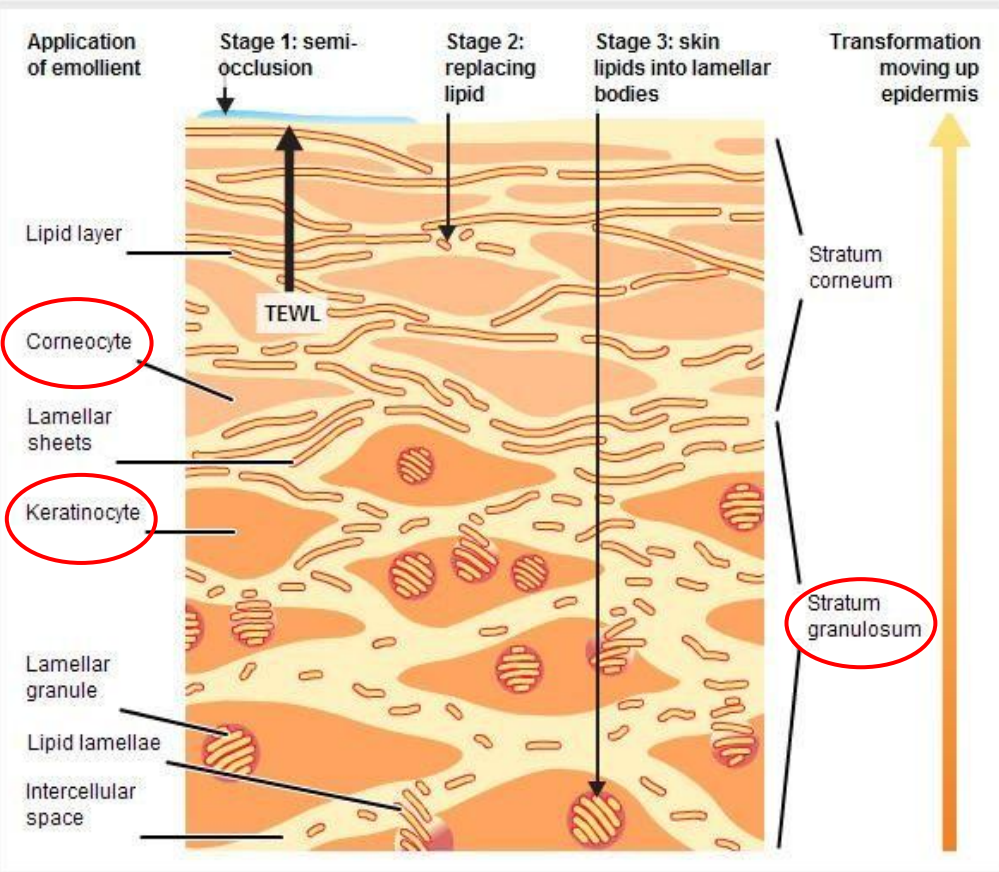


- Turunan Vitamin B
- Penyebab penyakit Pelagra
- Peran & mekanisme NA induksi dermatitis, belum jelas

- Studi pada sistem kultur keratinosit *human* menunjukkan bahwa NA (1.0 – 0.1  $\mu$ M) akan **meningkatkan sintesa seramida** 4-6 x (tergantung dosis), **glukosilseramid** 7 x, dan **sphingomyelin** 3 x pada kultur keratinosit (Gb.2).
- Ekspresi gen menunjukkan **NA meningkatkan *human long chain base* LCB1 dan LCB2 mRNA**, keduanya mengkode subunit LCB1 dan LCB2 dari **enzim pembatas laju dalam sintesis sphingolipid *Serine Palmitoyl Transferase (SPT)***
- NA meningkatkan permeabilitas penghalang di epidermis dengan merangsang **sintesis seramide** dan **lipid interseluler** (asam lemak dan kolesterol).
- NA merupakan salah satu bahan kosmetik yang dikembangkan secara cepat dengan bioteknologi, memiliki kemampuan mengatur hidrasi SC dari dalam kulit
- **$\beta$ -galaktosil-L-serin-diamide** (analog  $\beta$ -galactosylceramide) meningkatkan aktivitas  $\beta$ -glucocerebrosidase (berperan dalam konversi  $\beta$ -glucosylceramides  $\rightarrow$  seramides, yaitu seramida 1 dan 4 (termasuk acylseramides))

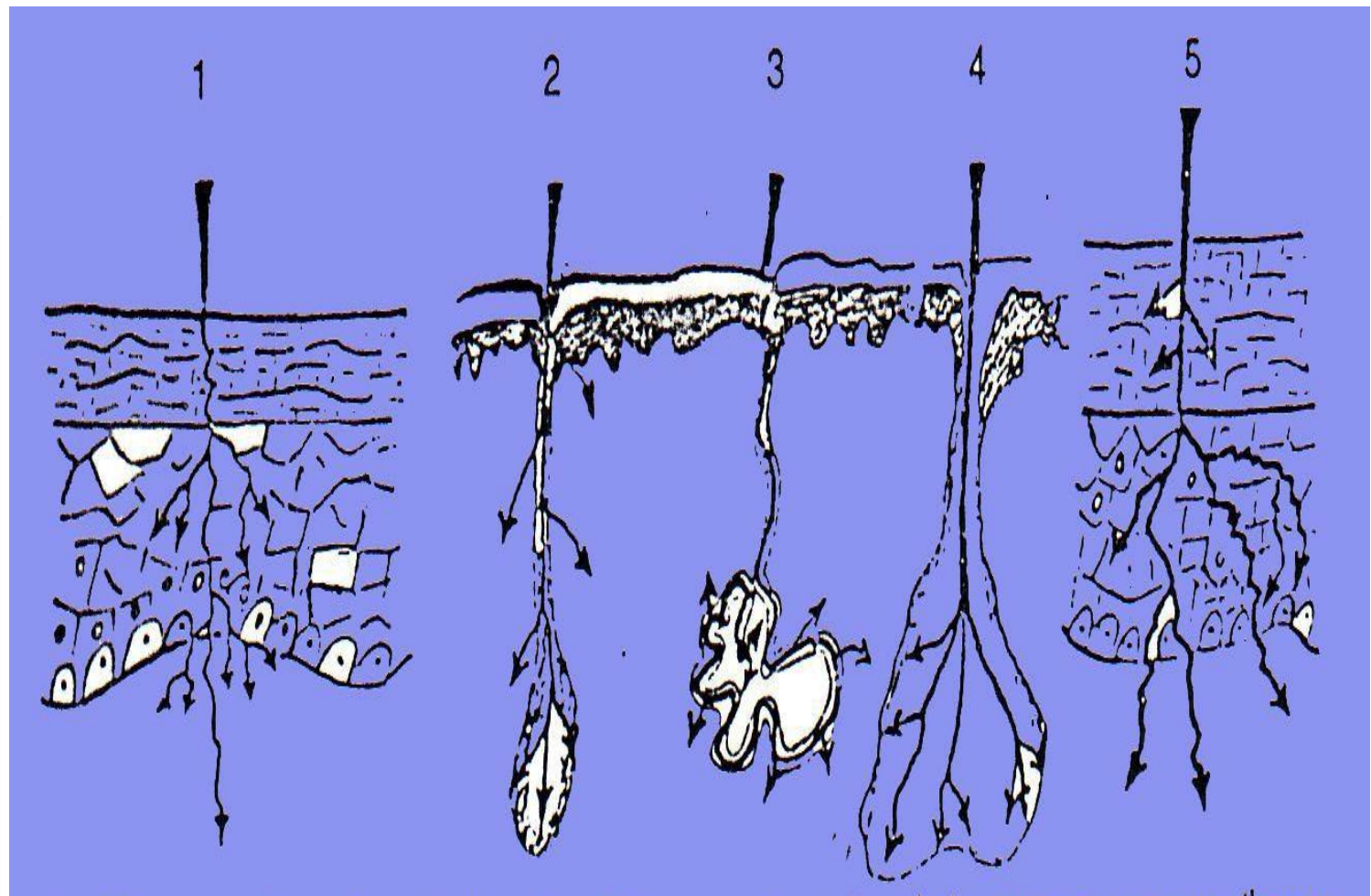
## BAHAN PELEMBAB KULIT :

1. OKLUSIF
2. HUMEKTAN
3. EMOLIENT



*Keratinosit berubah menjadi corneosit (keratinosit yang mati)*

## CARA PENETRASI SEDIAAN KOSMETIK MELALUI KULIT



Penetrasi melalui kulit dapat : (1) Melalui celah sel pada *str. corneum* (lap. tanduk), (2) Melalui dinding folikel rambut, (3) Melalui kelenjar keringat, (4) Melalui kelenjar sebaseus, (5) Melalui sel di *str. corneum*

# Kulit Kering – Kondisi TEWL naik atau normal?

## a. Kulit kering - Kadar air SC berkurang, **TEWL naik**

- Pada kulit yang **sering dicuci dengan sabun & air**.
- Hilangnya komponen SC (lipid interseluler dan NMF) akan mengurangi penghalang permeabilitas trans-epidermal sehingga **TEWL naik & kadar air menurun**
- Kulit kering akibat kelembaban & suhu yang rendah berkepanjangan, di musim dingin :
  - Pembentukan korneosit terganggu karena induksi kehilangan kadar air terus-menerus di SC dan
  - peningkatan proliferasi keratinosit menyebabkan **kadar ceramide SC turun** (selama musim dingin)
- Iradiasi UV menurunkan hidrasi SC dengan menguras lipid SC di badan lamelar
- **Fenotipe kulit** - Gejala umum kulit kering terlihat pada dermatitis kontak, iktiosis, dan psoriasis, menunjukkan keterlibatan **hiperproliferasi keratinosit** yang diinduksi inflamasi pada fenotipe SC dengan korneosit yang belum matang

## b. Kulit kering - Kadar air SC berkurang, **TEWL normal**

- Kulit pada orang tua kering bersisik, ditandai juga dengan penurunan hidrasi SC, tetapi **TEWL normal** atau kadang-kadang menurun.
- Laju pergantian epidermis menurun, terjadi **akumulasi lapisan-lapisan** yang mengalami kornifikasi ( $\pm 20$  lapisan) yang menurunkan TEWL dan mengurangi pasokan air ke lapisan atas SC. Fungsi permeabilitas penghalang epidermis **tampak normal** atau bahkan membaik.
- Pemulihan penghalang yang rusak pada kulit tua lebih lambat. Penurunan resistensi penghalang terkait gangguan **sintesis kolesterol**. Asam mevalonate (prekursor kolesterol) dengan aseton akan merubah resistensi penghalang pada SC, namun hal ini tidak terjadi pada kolesterol apabila diberi aseton.
- Pasien diabetes : Ketika kadar glukosa meningkat maka kadar air SC menurun. Temuan ini menunjukkan ada **faktor lain yang terlibat dalam pengaturan hidrasi SC**, selain NMF dan lipid interseluler

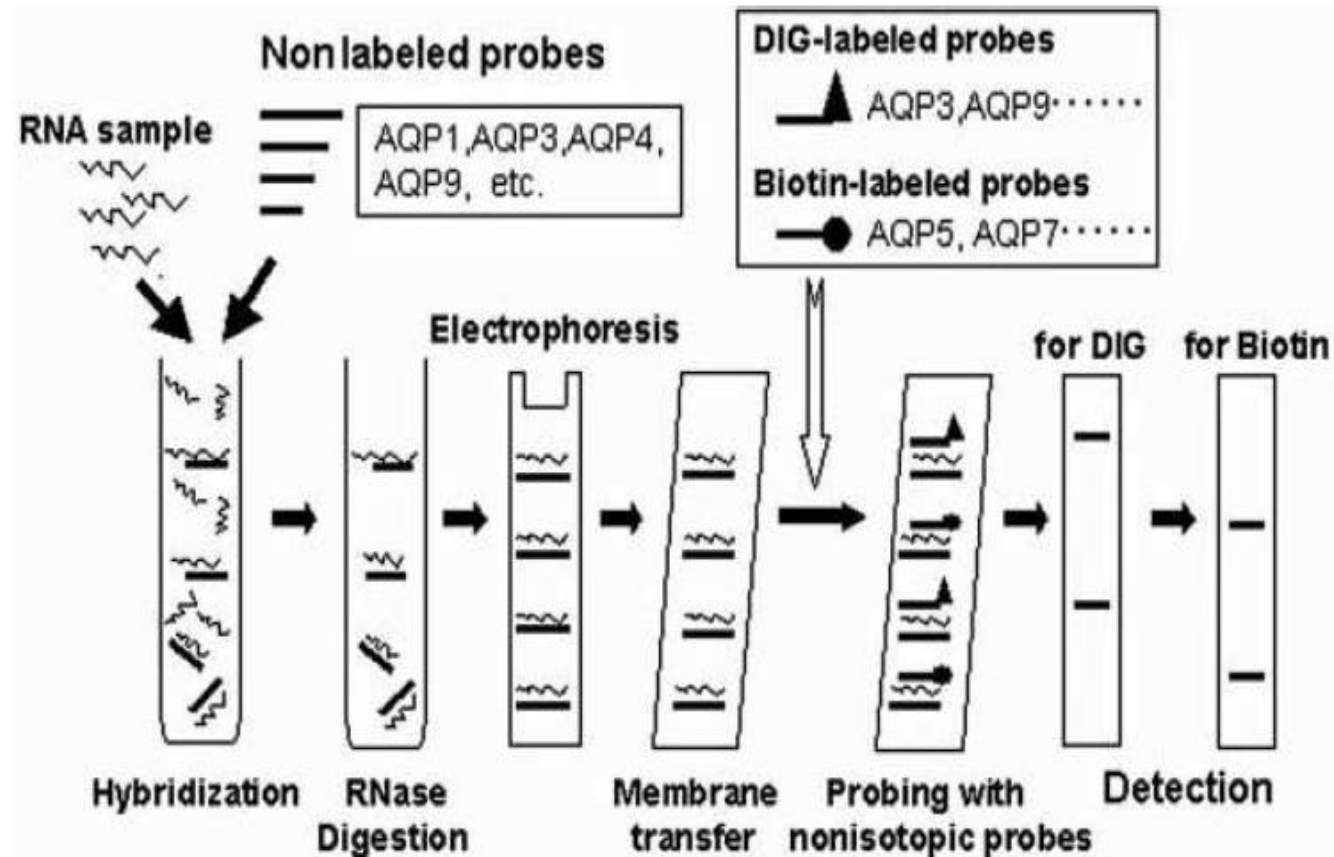
# AQUAPORIN - PENGATUR KESEIMBANGAN AIR PADA KULIT

Diketahui ada **11 Aquaporin/AQP** (AQP 0 sd AQP 10) yang telah dikloningkan pada mamalia : 7 AQP permeable dengan air; 4 lainnya (AQP3, AQP7, AQP9 & AQP10) permeable terhadap gliserol & urea

Penelitian AQP dimulai: **(1) uji RPA (Proteksi RNase non-radioaktif)**, metode baru yang membandingkan tingkat ekspresi berbagai gen AQP di kulit pada waktu bersamaan, secara kuantitatif.

RPA nonradioaktif mengandung proses hibridisasi mRNA gen target yang unik dengan probe yang tidak berlabel diikuti oleh **RNase digestion**.

mRNA yang tahan terhadap RNase, dikenakan elektroforesis dan hibridisasi kedua dengan probe berlabel biotin atau digoksinen (DIG). Dihasilkan pita tajam bersensitivitas tinggi, hasil sebanding dengan yang diperoleh dari probe berlabel  $^{32}\text{P}$ .



Gb. 3 Non-radioaktif RNase protection assay (RPA)  
*Singkatan* : AQP = Aquaporin; DIG = Digoxigenin

## Karakterisasi AQP pada Kulit

Hasil RPA nonradioaktif mengungkapkan AQP3 dan AQP9 diekspresikan pada kultur keratinosit manusia (Gbr. 4). Ekspresi AQP3 akan naik dengan tekanan osmotik yang diinduksi oleh estimasi fisiologis.

Hasil yang sama diperoleh dalam model ekuivalen kulit buatan yang terdiri dari fibroblas manusia dan keratinosit.

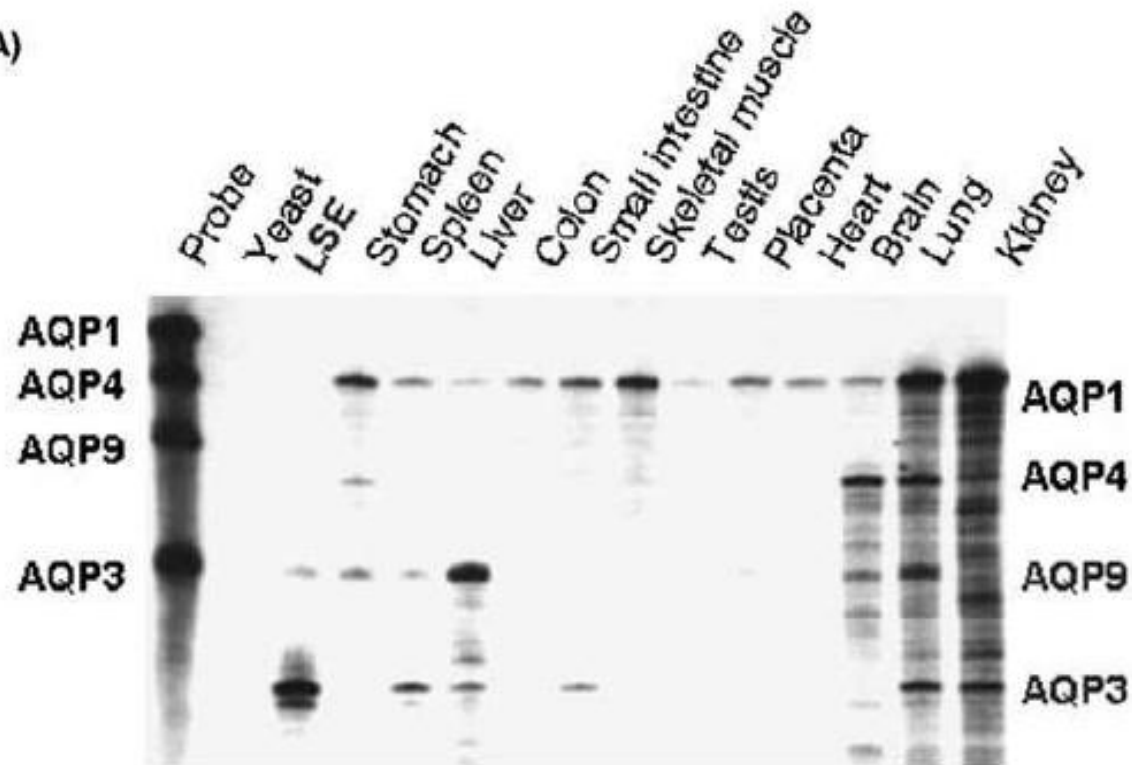
Hasil *imunostaining* kulit buatan dengan antibodi anti-AQP3 manusia yang spesifik mengungkapkan dengan jelas **Lokasi** membran sel keratinosit di epidermis (Gbr. 4).

**FUNGSI AQP DI KULIT** - dapat dijelaskan dengan sistem **tikus transgenik atau *knockout*** .

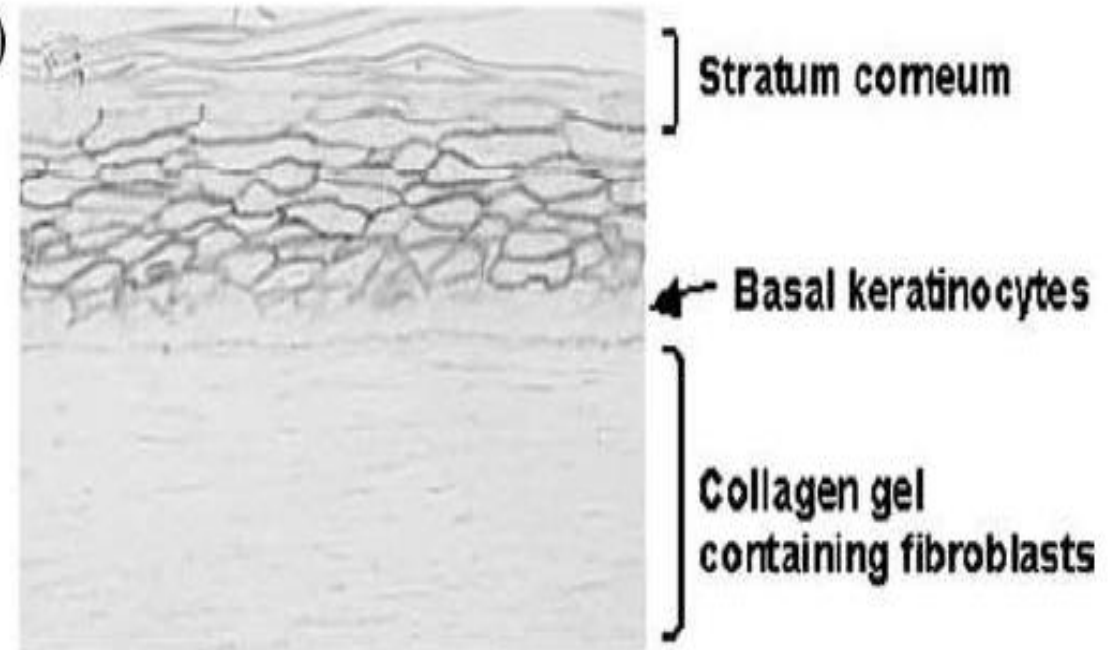
Kulit yang **kekurangan AQP3** menunjukkan **penurunan hidrasi SC** secara nyata, permeabilitas air dan gliserol menurun. Tikus yang kekurangan AQP3 menunjukkan kehilangan elastisitas kulit, dan **lambat** dalam penyembuhan luka serta pemulihan fungsi penghalang.

Penurunan permeabilitas air dan/atau gliserol tidak hanya memicu kulit kering dan rendahnya elastisitas, tetapi juga **mengubah fungsi fisiologis kulit** seperti terganggunya pemulihan penghalang epidermis dan penyembuhan luka. Gabungan hasil temuan ini dengan penelitian lain membuktikan bahwa pergerakan air merupakan proses penting dalam menjaga **homeostasis kulit**.

(A)



(B)



Gb. 4 Ekspresi mRNA dan protein AQP dalam kultur setara kulit manusia:

- (A) Uji Proteksi RNase nonradioaktif simultan dari AQP1, AQP3, AQP4, dan AQP9. LSE; epidermis dari kultur setara kulit manusia.
- (B) Immunostaining protein AQP3 dari kulit buatan yang dikultur menggunakan antibodi AQP3 manusia yang spesifik.

## Mempelajari Faktor Baru yang Terlibat dalam Pengaturan Keseimbangan Air menggunakan Kulit

### Tikus *Knockout* Kondisional Spesifik Epidermis

Dalam bidang perawatan kulit, **tikus *knockout* kondisional khusus epidermis** membantu peneliti untuk mengamati faktor-faktor baru yang terlibat dalam **pengaturan keseimbangan air di kulit**, terutama ketika *knock-out* sistemik dari gen target menghasilkan fenotipe embrionik yang mematikan pada tikus.

### Prinsip Penghilangan Spesifik Epidermis pada Gen Penarget

Teknologi ini didasarkan pada sifat unik enzim yang disebut **Cre recombinase** (Cre). Cre adalah **enzim penyambung gen** dalam bakteriofag P1 yang mengikat ke situs spesifik "LoxP" dengan urutan DNA 34 nukleotida. Enzim dapat menyambung urutan DNA yang terletak di antara dua situs LoxP melalui rekombinasi spesifik situs intramolekuler. Sistem Cre/LoxP ini dapat **digunakan untuk menghapus** jaringan spesifik dari urutan DNA yang ditargetkan antara situs LoxP jika promotor aktif yang berfungsi pada jaringan spesifik dapat dirancang sebagai pengatur ekspresi Cre. Dalam kasus rekombinasi spesifik epidermal dengan sistem Cre/LoxP, promotor K5 dari gen Keratin-5 dapat digunakan untuk memasukkan ekspresi Cre secara spesifik di epidermis.



## Knockout Spesifik Epidermal pada Gen ARNT

- **Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translokator (ARNT)**, faktor transkripsi dari keluarga gen Per/AHR/ARNT/Sim, mengatur ekspresi gen sebagai respons terhadap rangsangan lingkungan seperti **xenobiotik dan hipoksia**. Tikus baru lahir yang mengalami gangguan gen ARNT spesifik epidermal, tampak normal tetapi setelah lahir segera mati karena dehidrasi parah disebabkan kehilangan air. Fungsi penghalang epidermis tidak dapat dipertahankan tanpa komposisi seramida yang tepat melalui desaturase-4 yang diatur oleh ARNT.

## Pengurangan Spesifik Epidermal pada Tautan Protein GPI (Glikosilfosfatidilinositol)

- ***Pig-a***, sebuah gen X-linked yang terlibat pada tahap awal biosintesis tautan GPI. Gangguan gen ini menyebabkan **penghentian biosintesis GPI** pada *reticulum endoplasma*, menyebabkan kematian embrio karena tidak adanya tautan protein GPI pada permukaan sel.
- Tikus *Pig-a null* menjadi model hewan dalam memahami proses perolehan fungsi penghalang dan kapasitas menahan air pada epidermis. Tikus ini terlahir dengan kulit keriput, kering, dan hiperkeratotik (penebalan *str corneum*) dengan diferensiasi abnormal, dan mati setelah beberapa hari lahir. Fungsi barrier permeabilitas tikus *Pig-a null* “**abnormal**”, kenaikan TEWL secara nyata, struktur membran lamelar di SC abnormal. Analisis Western blot menunjukkan adanya **cacat pada monomer filaggrin** dengan ekspresi normal profilaggrin pada epidermis tikus *Pig-a null*, adanya gangguan **konversi profilaggrin menjadi bentuk monomerik**.



## HYALURONAN (HA)

adalah  
glikosaminoglikan  
berbobot molekul  
tinggi yang terdiri  
dari N-asetil  
glukosamin dan  
asam glukuronat

### Regulasi Sintesis HA di Epidermis & Dermis oleh Lokus Gen HA sintetase yang Berbeda

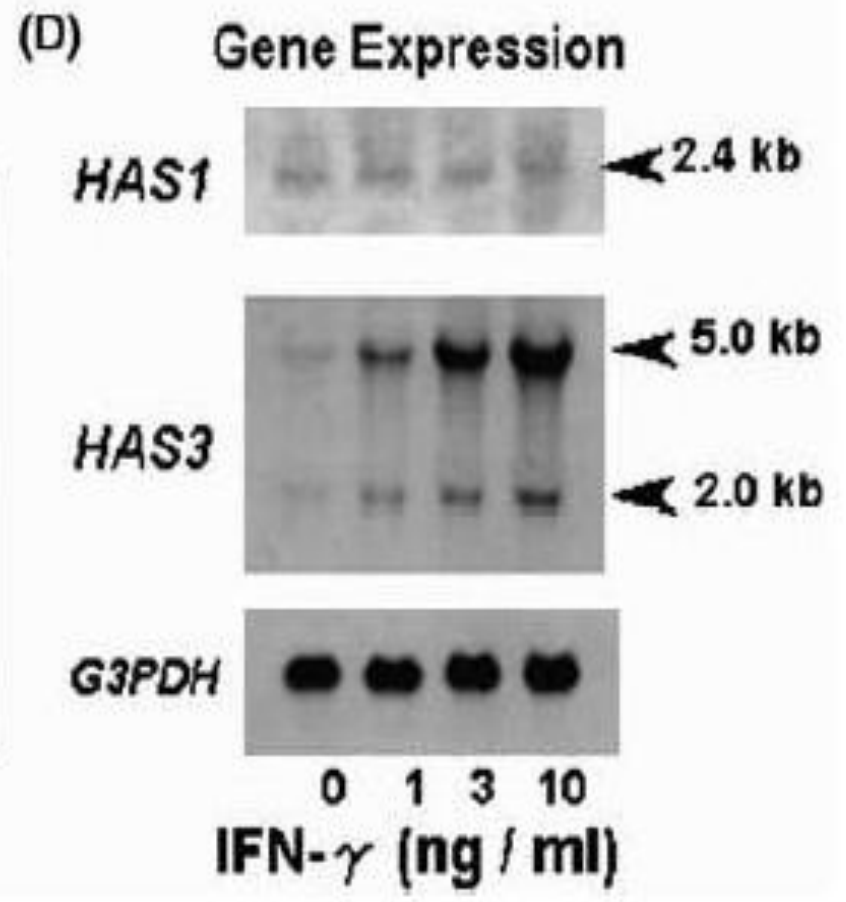
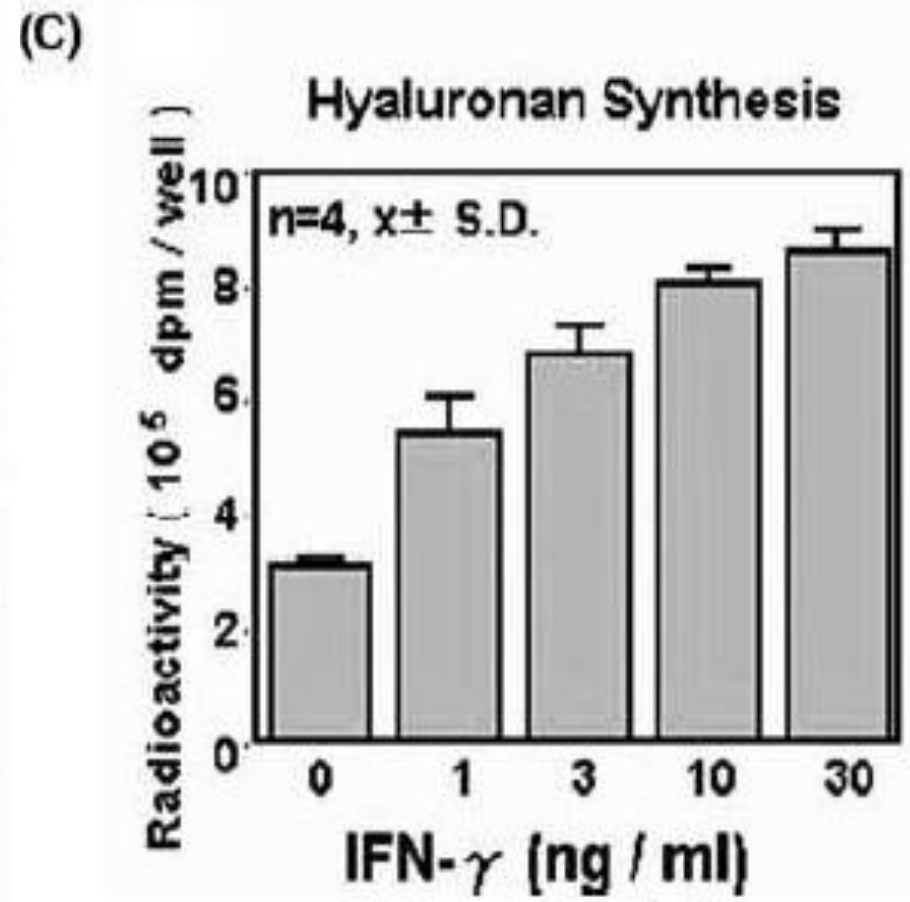
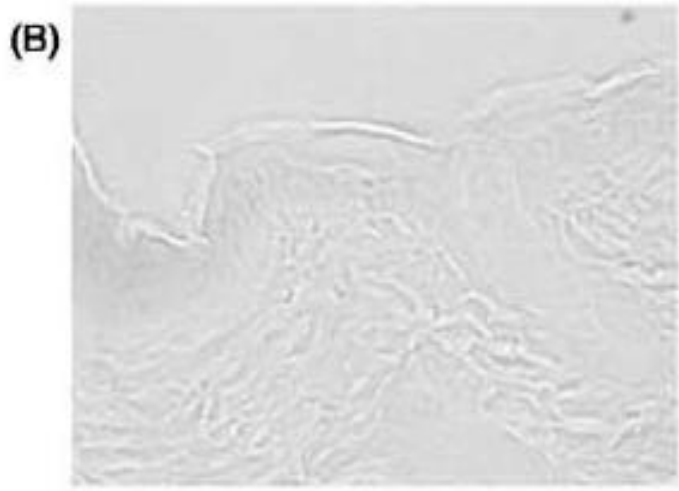
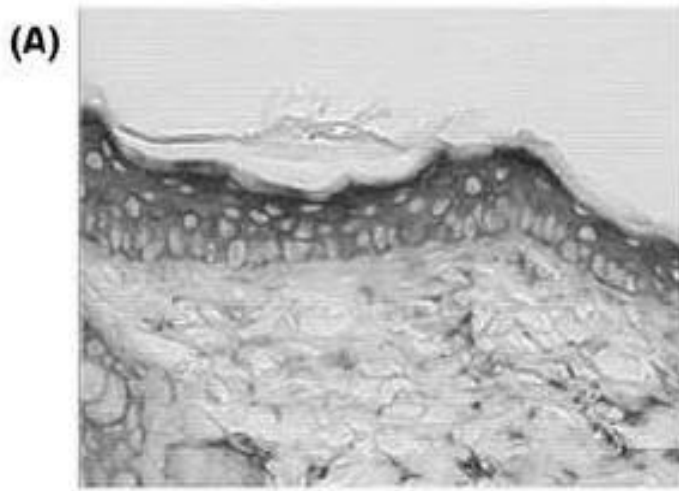
- Fungsi utama HA adalah menahan air, menjaga ruang ekstraseluler, dan memfasilitasi pengangkutan ion terlarut dan nutrisi, HA dapat mengubah struktur matriks ekstraseluler dan memodulasi daya rekat sel yang mempengaruhi proses pertumbuhan sel, migrasi sel, diferensiasi sel, angiogenesis, dan regulasi imun.
- Distribusi HA - luas pada berbagai jaringan, namun jumlah HA terbesar berada di kulit ( $\pm$  50%) atau 0,5-1,0 mg/g berat jaringan basah. Di kulit, HA terutama diproduksi oleh **fibroblas dan keratinosit**, dan pada mamalia pergantiannya relatif cepat 2 hingga 4,5 hari, artinya sintesis & degradasi HA dikontrol secara ketat dan dinamis di kulit.
- Kandungan HA menurun selama penuaan, dan **hilangnya kandungan HA** merupakan salah satu **faktor penyebab kulit kering**, terbentuknya kerutan, dan berkurangnya elastisitas pada kulit tua. Pengaturan metabolisme HA di kulit sangat penting untuk melembabkan kulit.

## Gen yang terlibat pada sintesa HA di Kulit

- HA disintesa oleh protein **HA synthetase (HAS)**, keluarga enzim terikat membran yang dikodekan oleh tiga gen yang berbeda secara genetik: **HAS1, HAS2, dan HAS3** (Gambar 6).
- HAS berperan penting dalam sintesa HA. Fungsi HA *in-situ* & regulasi gen ekspresi HAS belum jelas
- Teknik hibridisasi mRNA *in-situ* menunjukkan bahwa kulit tikus mengekspresikan semua mRNA HAS di **dermis & epidermis**, tetapi setiap gen HAS diatur oleh **faktor bioaktif intrinsik**.
- Analisis *Northern blot*, **fibroblas** kulit manusia yang dikultur mengekspresikan mRNA HAS1 & HAS2, stimulasi dengan Transforming Growth Factor **TGF- $\beta$**  yaitu sitokin multifungsi yang penting dalam berbagai proses biologis (termasuk pertumbuhan, perkembangan, dan penyembuhan luka) akan menginduksi *up-regulated* keduanya.
- Keratinosit manusia terutama mengekspresikan **mRNA HAS3**. Efek stimulasi dengan IFN- $\gamma$  dan TGF- $\beta$  terhadap HAS3, berlawanan. **IFN- $\gamma$**  *up-regulated* sedangkan **TGF- $\beta$**  menyebabkan *down-regulated* HAS3, tapi tidak berefek pada HAS1 dan HAS2.
- Asam retinoat merupakan bahan yang ditargetkan untuk mengekspresikan gen HAS3 karena dapat memperbaiki kerutan dan menebalkan epidermis serta meningkatkan kadar HA epidermis

## **Discovery of HA in the SC (Penemuan HA di SC)**

- Untuk mengkonfirmasi lokalisasi HA di epidermis dan dermis digunakan **teknik baru histokimia** dengan protein pengikat HA biotinilasi yang spesifik dan sensitif terhadap HA. Keberadaan HA di **ruang antarsel** epidermis, terutama lapisan **spinosus tengah**, tidak ada di SC atau *str. granulosum*.
- HA dianggap tidak ada di SC normal, namun dalam hibridisasi mRNA *in situ* epidermis terdapat beberapa sinyal kuat mRNA HAS pada *stratum granulosum* (Gbr. 6). Dilakukan penelitian untuk mengetahui lokalisasi HA (apakah pada *str. granulosum* atau *str. corneum*).
- Jika HA ada di SC, kapasitas retensi air sangat tinggi dan berperan penting sebagai NMF. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dipakai mengukur kandungan HA dan diketahui keberadaan HA di SC tikus normal dengan berat kering HA pada SC **22,3 ± 3, 15**; epidermis **1 ± 2**; dan dermis **739 ± 32** µg/g. Penelitian dengan pelacak [<sup>3</sup>H]-glukosamin dalam kultur organ kulit mengungkapkan perpindahan HA berlabel [<sup>3</sup>H] dari lapisan **epidermis ke SC**.
- Untuk pertama kalinya diketahui HA dipasok dari keratinosit di bawah lapisan SC dan berada pada SC normal. Diduga HA berperan dalam melembabkan SC dan/atau mengatur sifat mekanisnya.



Gambar 6. Ekspresi dan regulasi mRNA HAS3 pada keratinosit epidermis. (A) dan (B) hibridisasi in situ mRNA HAS3 pada kulit tikus. (A) Probe RNA antisense berlabel DIG; (B) Probe RNA sense berlabel DIG (kontrol). (C) Produksi HA yang bergantung pada dosis ditingkatkan oleh IFN- $\gamma$  pada keratinosit manusia yang dikultur. (D) Ekspresi mRNA HAS3 yang bergantung pada dosis ditingkatkan oleh IFN- $\gamma$  pada keratinosit manusia yang dikultur. SINGKATAN: **DIG**, digoksin; **G3PDH**, gliseraldehida-3-fosfatdehidrogenase; HAS, hialuronan

## Skrining Bahan Aktif yang dapat Meningkatkan HAS3

- **N-metil-L-serin** (NMS) merupakan turunan asam amino, dapat meningkatkan produksi HA pada fibroblas dermal. Uji coba pada kulit manusia menunjukkan **NMS meningkatkan aktivitas** enzim fraksi membran, tetapi **tidak dapat meningkatkan gen HAS**, sehingga NMS banyak dipakai dlm *personal care*.
- **Asam retinoat (RA)** merupakan pemicu kuat HA diproduksi pada epidermis. Awalnya RA diperkenalkan sebagai obat, dan hasil uji klinis secara topical RA mengurangi kerutan, namun efek sampingnya seperti iritasi, exfoliating/pengelupasan, & gatal pada kulit menyebabkan **RA tidak cocok sbg bahan kosmetik**.
- Alternatif RA yaitu **N-acetylglucosamine** (NAG), suatu monosakarida yang diperoleh dari kitin kepiting. Komponen utama NAG adalah karbohidrat kompleks, **merupakan produk degradasi oligosakarida yang diinduksi lisosom dari glikoprotein dan glikolipid**. Penambahan NAG eksogen meningkatkan produksi HA dalam keratinosit yang dikultur, meningkatkan juga kumpulan UDP (uridin 5'-diphospho)-NAG intraseluler sebagai **substrat HAS**, sedangkan ekspresi gen HAS3 & tidak mempengaruhi aktivitas kedua HAS.
- $\beta$ -karoten menunjukkan efek mirip RA dalam menginduksi ekspresi gen HAS3, efeknya dibuktikan menggunakan analisis Northern blot.  **$\beta$ -karoten berubah menjadi RA pada keratinosit** namun masih perlu dikonfirmasi. Banyak digunakan kombinasi  $\beta$ -karoten & NAG dalam kosmetik, misal NAG dengan retinal; NAG dengan  $\beta$ -karoten