

PENGARUH TERAPI KURKUMIN TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID (MDA) HASIL ISOLASI PAROTIS DAN PROFIL PROTEIN TIKUS PUTIH YANG TERPAPAR LIPOPOLISAKARIDA (LPS)

Rizky Prayoga Darwadi, Aulanni'am*, Chanif Mahdi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Periodontitis merupakan penyakit mulut dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut. Salah satu bakteri yang diduga sebagai penyebab periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis*. Merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen karena membran terluar bakteri tersusun oleh LPS (Lipopolisakarida). LPS diketahui dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (*inflammatory*) pada sel makrofag dan sel lainnya yang diikuti dengan terbentuknya radikal bebas. Kurkumin dapat digunakan sebagai terapi karena berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi kurkumin terhadap MDA dan profil protein pada tikus yang terpapar LPS. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok tikus yaitu kontrol, terpapar LPS secara intrasulkuler dan terapi kurkumin. Pengukuran kadar MDA menggunakan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) dan profil protein menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan paparan LPS mampu meningkatkan kadar MDA secara signifikan ($p,0,01$) dan juga terdapat beberapa pita protein yang hilang pada metode SDS-PAGE, sebaliknya pada terapi kurkumin kadar MDA memiliki pengaruh menurunkan kadar MDA dan munculnya pita protein yang rusak.

Kata kunci: Lipopolisakarida, Malondildehid, profil protein, radikal bebas

ABSTRACT

Periodontitis is an oral disease and infections caused by gram-negative anaerobic bacteria in the oral cavity. One of the bacteria suspected as the cause of periodontitis is *Porphyromonas gingivalis*. It is a gram-negative bacteria that are pathogenic for bacterial outer membrane composed by LPS (lipopolysaccharide). LPS is known to trigger some kind of reaction to inflammation or infection (*inflammatory*) in macrophages and other cells, followed by the formation of free radicals. Curcumin can be used as a treatment because it serves as an antioxidant. This study aimed to determine the effect of curcumin treatment on MDA and protein profiles in mice exposed to LPS. This study used three groups of mice, namely the control, LPS exposure in intrasulkuler and curcumin therapy. Measurement of MDA using the thiobarbituric acid (TBA) and protein profiles using SDS-PAGE. Results showed exposure to LPS can increase levels of MDA significantly ($p, 0.01$) and also there are some missing protein bands on SDS-PAGE method, in contrast to the therapeutic effect of curcumin had lower MDA MDA levels and the appearance of protein bands were broken.

Keywords: Lipopolisakarida, Malondildehid, profil protein, radikal bebas

PENDAHULUAN

Periodontitis merupakan penyakit mulut dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut yang dapat menyebabkan kematian [1]. Salah satu bakteri yang diduga sebagai penyebab periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis* [2]

yang merupakan bakteri gram negatif bersifat patogen karena membran terluar bakteri tersusun oleh LPS (Lipopolisakarida). LPS dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (*inflammatory*) pada sel makrofag dan sel lainnya. Produk dari tahapan infeksi ini dapat menyebabkan kerusakan organ salah satunya adalah parotis.

Menurut Beumer [3], LPS dapat menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang, seperti *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar yang bersifat sangat toksik dan dapat mengakibatkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel hingga ke organ tubuh. Beberapa penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas diantaranya adalah stroke, asam, diabetes mellitus, dan AIDS [4]. Kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh ROS ditandai dengan diproduksinya senyawa Malondialdehid (MDA) [5]. Malondialdehid (MDA) dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas di dalam tubuh [6].

Beberapa studi dilaporkan bahwa suplementasi bahan yang mengandung antioksidan dapat memperbaiki proses pencernaan dan rongga mulut. Kurkumin merupakan senyawa yang mengandung antioksidan karena memiliki aktivitas antibakteri, antivirus, dan penginduksi apoptosis tesis sel (antitumor) [7]. Oleh sebab itu kurkumin dapat digunakan sebagai terapi sehingga dapat menurunkan aktivitas radikal bebas di dalam tubuh yang ditandai dengan penurunan kadar malondialdehid (MDA).

Berdasarkan hal di atas maka dalam penelitian ini dikaji pengaruh terapi kurkumin terhadap kadar malondialdehid (MDA) kelenjar parotis tikus putih yang terpapar LPS menggunakan objek teliti yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hal ini sesuai karena tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia [8].

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan berusia 2 bulan dengan berat 100-150 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA UB Malang. Lipopolisakarida (*Porphyromonas gingivalis* LPS 2 mg/mL serotype 0,55:B5, Sigma Chemical co.). Penggunaan hewan coba untuk penelitian ini telah sah dengan mendapat layak etik nomor 116-KEP-UB.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah MD. Bio Inc (Na₂HPO₄. H₂O, KCl, KH₂PO₄, NaN₃ 1%, Formaldehid 37%, NaCl, glisin, Tris-HCl, Tris Base), Pharmacia

Biotech (Ammonium persulphate, TEMED), Bio-Rad Lab. (PMSF, Tween-20), Etanol absolut 99% (Merck.), Acrylamide (MP Biomedicals Inc.), Bis-acrylamide (Bio Basic Inc), β -merkaptoetanol (MP Biomedicals Inc.), Bromophenol blue (Merck), commassive brilliant blue R-350 (SIGMA-Aldrich Co. Germany), TCA , NaCl-fis 0,9%, kit MDA, TBA, dan akuades steril.

Prosedur penelitian penggunaan hewan coba

Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok pertama bertindak sebagai kontrol kelompok kedua diberi paparan Lipopolisakarida (LPS) intrasulkurel dan kelompok ketiga diberi paparan Lipopolisakarida (LPS) sekaligus terapi kurkumin kepada tikus yang terpapar lipopolisakarida.

Pemaparan lipopolisakarida dan terapi kurkumin pada hewan coba

Kelompok kedua dan ketiga diberi paparan LPS dengan dosis 0,3 μ g/mL sebanyak 200 μ L, kemudian diinkubasi selama 12 hari. Kelompok ketiga diberi paparan LPS sekaligus diberi terapi kurkumin 1% sebanyak 2mL per hari. Perlakuan ini dilakukan selama 12 hari. Pada hari ke-13 tikus dibedah dan diambil organ parotis serta darahnya untuk penelitian.

Pengukuran kadar malondialdehid (MDA)

Supernatan parotis diambil 100 μ L, ditambahkan 550 μ L akuades, 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-thio. Pada setiap penambahan reagen, larutan dihomogenkan dengan vorteks. Disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan diambil dan dipindahkan pada tabung reaksi baru. Selanjutnya diinkubasi dalam penangas pada temperatur 100 $^{\circ}$ C selama 30 menit dan dibiarkan pada suhu ruangan. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentasi sampel.

Profil protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE

Darah didiamkan sekitar 3-5 jam dalam posisi miring 45 $^{\circ}$ selama 0.5-1 jam. Bila belum terpisah sempurna dapat didiamkan selama 3-5 jam. Setelah darah dan serum terpisah, dilakukan proses sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

Serum yang telah didapat dipipet 200 μ L, ditambahkan PBST-PMSF 1 mL, disonikasi 10 menit, disentrifugasi selama 15 menit 6000 rpm, diambil supernatan dan ditambah etanol absolut sebanyak 1:1 volume dan disimpan semalam dengan temperatur -20 $^{\circ}$ C, disentrifugasi selama 15 menit 6000 rpm, dibuang etanol dan endapan dikering sampai bau etanol hilang dan ditambahkan Tris-HCL 20 mM pH 6,8 dengan volume 1:1.

Hasil isolasi protein masing-masing diambil 10 μ L, ditambahkan 10 μ L larutan Tris-HCl dan 20 μ L RSB. Dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 10 menit. Selanjutnya dimasukkan sampel dalam sumuran gel dengan volume 30 μ L setiap sumuran. Salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar yang telah diperlakukan sama seperti sampel sebagai sampel. Kemudian dilakukan running dengan sumber arus listrik dengan arus sebesar 28 mA 128 Volt selama 2-3 jam. Dihentikan proses pemisahannya jika warna penanda biru \pm 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek terapi kurkumin terhadap kadar MDA parotis tikus yang terpapar lipopolisakarida

Malondialdehida merupakan produk akhir dari oksidasi lipid. Tingginya kadar MDA dipengaruhi oleh kadar peroksidasi lipid, yang secara tidak langsung juga menunjukkan tingginya jumlah radikal bebas. Pada analisis malonaldehida ini tampak bahwa kelompok sehat memiliki kadar MDA terendah yaitu sebesar 0,801 μ g/mL dan tertinggi dimiliki oleh kelompok Sakit yaitu sebesar 3,271 μ g/mL .

Tabel 1. Data kadar MDA

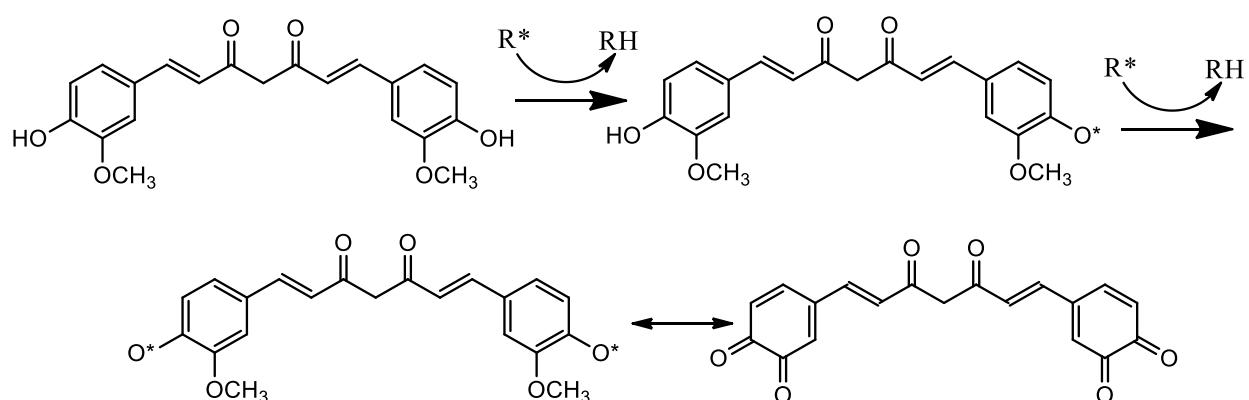
Kelompok	Rata-rata kadar MDA
Kontrol	0,801 \pm 0,177
Sakit	3,271 \pm 0,506
Terapi	2,307 \pm 0,292

Pada tikus yang terpapar Lipopolisakarida, peningkatan rataan kadar MDA jaringan parotis diduga sebagai akibat peningkatan produksi radikal bebas. LPS dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Pada tabel terlihat bahwa kadar MDA pada tikus yang terpapar LPS memiliki kenaikan yang cukup signifikan yaitu sebesar 75%. hasil analisis ini membuktikan bahwa LPS memberikan pengaruh negatif pada tikus dengan meningkatnya kadar radikal bebas dalam tubuh. Namun pemberian terapi kurkumin mampu menurunkan jumlah radikal bebas yang terbentuk tersebut hingga 38%.

Adanya paparan senyawa toksik seperti LPS dapat memicu peningkatan produksi radikal bebas yang berlebih dan pada akhirnya menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara jumlah oksidan (radikal bebas) dengan antioksidan yang ada di dalam tubuh. Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan biokimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleat membran sel yang terdiri dari komponen-komponen

lipid. Serangan radikal bebas terhadap komponen lipid akan menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang menghasilkan produk akhir yaitu MDA yang bersifat sangat toksik terhadap sel.

Pemberian terapi kurkumin dapat menurunkan kadar MDA yaitu dengan cara kurkumin akan mendonasikan sebuah atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (R^*). Reaksi ini akan menghasilkan suatu radikal fenoksil kurkumin atau flavonoid (KO^*/FO^*) yang kurang reaktif karena (KO^*/FO^*) dapat mengalami perubahan struktur resonansi dengan meredistribusikan elektron yang tidak berpasangan dalam struktur ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatiknya. (KO^*/FO^*) akan bereaksi lebih lanjut membentuk senyawa yang tidak reaktif, yang kemungkinan melalui reaksi terminasi radikal-radikal. Melalui reaksi tersebut, kurkumin dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinisiasi oleh radikal bebas.



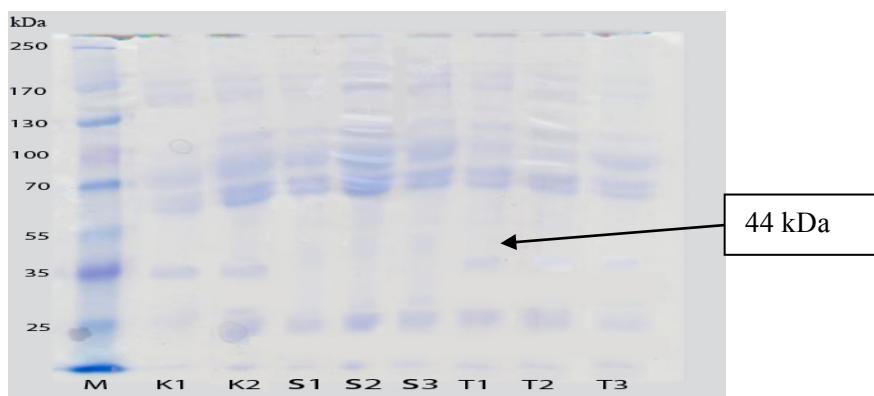
Gambar 1. Reaksi Penghambatan Radikal Bebas Oleh Kurkumin

Efek terapi kurkumin terhadap profil protein darah tikus yang terpapar lipopolisakarida

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan atau penurunan aktivitas antioksidan enzimatis, dalam hal ini adalah Glutathion peroksidase (GSH) dan Superokida dismutase (SOD) yang berpotensi dalam merusak beberapa protein karena terbentuknya radikal bebas. Pada penelitian ini, lipopolisakarida merupakan pemicu terjadinya beberapa kerusakan pita protein pada darah tikus. Kerusakan pita protein dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan perbandingan kondisi kerusakan protein darah tikus yang terpapar LPS dengan tikus yang mendapatkan terapi kurkumin. Dari tabel terlihat bahwa pita-pita protein tikus yang terpapar LPS (Tabel 2.Sakit) mengalami kerusakan sel dibandingkan dengan pita protein tikus yang telah mendapatkan terapi kurkumin (Tabel 2. Terapi). Terdapat beberapa protein yang hilang (44 kDa), hal ini dikarenakan LPS dapat berikatan dengan

makromolekul seperti LPS-*Binding Protein* (LBP). LBP merupakan sel-sel epitel saluran pencernaan yang mempunyai gugus yang bersifat nukleofilik dengan ujung NH₃⁺ yang berperan aktif dalam pengikatan lipid A dari LPS. Ketika LBP berikatan menjadi kompleks LBP-LPS akan menstimulasi makrofag untuk memproduksi dan melepas sitokin pro-inflamasi sehingga terjadi pelepasan sel-sel radang.



Gambar 2. Gel hasil elektroforesis M = Marker, K = Kontrol, S = Sakit, T = Terapi

Tabel 2. Berat molekul protein K = Kontrol, S = Sakit, T = Terapi

Sumuran	BM Protein (kDa)								
	32	35	44	59	76	89	223	245	
K	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
S	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	
T	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa paparan LPS (Lipopolisakarida) mampu meningkatkan kadar MDA parotis tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 75% dan mengalami kerusakan pita protein pada protein dengan berat molekul 44 kDa. Pemberian terapi kurkumin 1% sebanyak 2 mL mampu menurunkan kadar MDA sebesar 38% pada kelenjar parotis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mendapat paparan LPS dan memperbaiki pita protein yang mengalami kerusakan pada protein dengan berat molekul 44 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ditujukan kepada drg. Agung Krismariono, M.Kes., Sp.Perio. atas kesempatannya dalam memberikan ijin untuk menjadi payung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aiache, J. M., J. Ph. Devissaguet, And M. M. Guyot-Hermann, 1993, *Farmasetika 2: Biofarmasi*, Airlangga University Press, Surabaya.
2. Chun, Y. H. P., Chun, K. R. J., Olguin, D. A., Wang, H. L., 2005, Biological Foundation For Periodontitis As A Potential Risk Factor For Atherosclerosis; 40: 87-95.
3. Beumer, C., Marty W., Willem R., Danielle R., Ruud B., Willem S., 2003, *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, A Novel Therapeutic Drug For Lipopolysaccharide (Lps)-Mediated Diseases, Attenuates Lps Toxicity In Mice And Piglets*, The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 307(2):737-744.
4. Hudgson, E., 2004, *A Text Book Of Modern Toxicology*, Three Edition, Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. Publication. P. 263-269.
5. Mahdi, C., 2010, *Bahaya Makanan Berformalin Dan Cara Mengatasinya*, Pidato Pengukuhan Guru Besar Dalam Bidang Ilmu Biokimia, Universitas Brawijaya, Malang.
6. Widodo, M. A., 1995, *Efek Pemicu Radikal Bebas Dan Vitamin E Pada Diabetes Komplikasi Pembuluh Darah Tikus Diabetes*, Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 1992-1995, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
7. Bermawie, N., 2006, *Mengatasi Demam Berdarah Dengan Tanaman Obat*, Warta Penelitian Dan Pengembangan Pertanian 28: 6-8.
8. Kusumawati, D., 2004, *Bersahabat Dengan Hewan Coba*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.