

**Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid
(MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang
Terpapar Lipopolisakarida (LPS)**

SKRIPSI

oleh:

RIZKY PRAYOGA DARWADI

0810923023



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid
(MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang
Terpapar Lipopolisakarida (LPS)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang Kimia

oleh:

RIZKY PRAYOGA DARWADI

0810923023



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS)

oleh:

RIZKY PRAYOGA DARWADI
0810923023

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Drh. Aulanni'am, DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19520412 198002 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. SasangkaPrasetyawan, MS
NIP. 19630404 1987011001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rizky Prayoga Darwadi

NIM : 0810923023

Jurusan : Kimia

Penulisskripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
 2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.
- Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2013
Yang menyatakan,

(Rizky Prayoga Darwadi)
NIM. 0810923023

Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS)

ABSTRAK

Periodontitis merupakan penyakit mulut dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri anaerob gram negatif. Salah satu bakteri yang diduga sebagai penyebab periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis*. Dimana pada membrane terluar bakteri tersusun oleh LPS (Lipopolisakarida) yang dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (*inflammatory*) dan diikuti dengan terbentuknya radikal bebas. Kurkumin dapat digunakan sebagai terapi karena berfungsi sebagai antioksidan. Injeksi LPS secara intrasulkular molar rahang atas. Penelitian dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan tikus putih terpapar LPS yang diterapi dengan kurkumin 1% selama 12 hari untuk 3 tikus (volume pemberian terapi per oral = 2 mL/tikus). Hasil penelitian menunjukkan paparan LPS mampu meningkatkan kadar MDA secara sangat nyata ($p < 0,01$) sebesar 75% terhadap tikus kontrol dari $(0,801 \pm 0,177) \mu\text{g/mL}$ menjadi $(3,271 \pm 0,506) \mu\text{g/mL}$ dan diterapi dengan kurkumin dapat menurunkan kadar MDA sebesar 38% dari $(3,271 \pm 0,506) \mu\text{g/mL}$ menjadi $(2,037 \pm 0,292) \mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: kurkumin, lipopolisakarida, malondialdehid

Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS)

ABSTRACT

Periodontitis is an oral disease and infections caused by gram-negated anaerobic bacteria. One of the bacteria suspected as the cause of periodontitis is Porphyromonasgingivalis. wherein the bacterial outer membrane composed by LPS (lipopolysaccharide) that can trigger some kind of reaction to inflammation or infection (inflammatory) and followed by the formation of free radicals. Curcumin can be used as a treatment because it serves as an antioxidant. LPS injection in the maxillary molar intrasulkular. The study was conducted in vivo using mice exposed to LPS-treated with curcumin 1% for 12 days for 3 rats (oral therapy volume = 2 mL / rat). Results showed exposure to LPS can increase levels of MDA are highly significant ($p < 0.01$) by 75% of the control mice (0.801 ± 0.177) mg / mL to (3.271 ± 0.506) mg / mL and treated with curcumin could reduce levels of MDA 38% of (3.271 ± 0.506) mg / mL to (2.037 ± 0.292) mg / mL

Key words : curcumin, lipopolysaccharide, malondialdehyde

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS)”**. Penelitian ini merupakan kajian panjang dari penelitian tentang peran LPS dalam menginduksi inflamasi yang diketahui oleh Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES dan Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS, sebagai Dosen Pembimbing I dan II yang telah bersabar meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan tugas akhir ini.
2. Drs. Budi Kamulyan, M.Sc, sebagai dosen penasehat akademik yang telah memberikan semangat dan saran kepada penulis selama masa studi.
3. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS dan Ir. Bambang Ismuyanto, MS, sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu.
4. Orang tua, keluarga dan teman-teman di laboratorium biokimia yang selalu memberikan motivasi, doa dan perhatian kepada penulis hingga terselesaikannya tugas akhir ini.
5. Rekan-rekan di jurusan kimia, khususnya angkatan 2008 dan semua pihak yang turut membantu penyelesaian tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis megharapkan saran yang membangun dari pembaca dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Januari 2013

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lipopolisakarida (LPS)	4
2.2 Kelenjar Parotis	5
2.3 ROS	5
2.4 Malondialdehid (MDA).....	6
2.5 Antioksidan	7
2.6 Kurkumin	8
2.7 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
2.8 Hipotesis.....	10
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	
3.2.1 Bahan Penelitian.....	11
3.2.2 Alat Penelitian	12
3.3 Tahapan Penelitian	13

3.4	Prosedur Kerja	
3.4.1	Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	13
3.4.2	Pengambilan Parotis dan Darah	13
	3.4.2.1 Pengambilan Parotis	13
	3.4.2.2 Pengambilan darah	13
3.4.3	Isolasi Parotis dan Darah.....	14
	3.4.3.1 Isolasi Parotis	14
	3.4.3.2 Isolasi Protein pada Darah.....	14
3.4.4	Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA).....	14
	3.4.4.1 Penentuan λ maks MDA.....	14
	3.4.4.2 Penentuan Kadar MDA menggunakan Uji TBA.....	15
3.4.5	Penentuan Profil Protein dari Darah dengan Teknik SDS-PAGE	15
	3.4.5.1 Persiapan Gel.....	15
	3.4.5.2 Injeksi Sampel dan Running.....	16
	3.4.5.3 Perlakuan setelah Running	16
	3.4.5.4 Penentuan Berat Molekul	16
3.4.6	Analisis Data	17

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Efek Terapi Kurkumin Terhadap Kadar MDA Parotis Tikus yang Terpapar LPS	19
4.2	Efek Terapi Kurkumin Terhadap Profil Protein Darah Tikus yang Terpapar LPS	22

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	25
5.2	Saran.....	25

DAFTAR PUSTAKA	26
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	30
----------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Kelenjar Parotis	5
Gambar 2.2	: Struktur MDA.....	6
Gambar 2.3	: Reaksi Pembentukan MDA dengan TBA.....	7
Gambar 2.4	: Reaksi Penghambatan Antioksidan Primer Terhadap Radikal Lipida	7
Gambar 2.5	: Mekanisme Transfer Hidrogen Senyawa Fenol	7
Gambar 2.6	: Struktur Kurkumin.....	8
Gambar 4.1	: MekanismereaksiPeroksidasi Lipid.....	21
Gambar 4.2	: Reaksi Penghambatan Radikal Bebas oleh Senyawa Kurkumin	22
Gambar 4.3	: Gel Hasil Elektroforesis Darah.....	23
Gambar 4.4	: Mekanisme Reaksi Pembentukan Kompleks LPS-LBP.....	24
GambarC.1	: KurvaPanjang Gelombang Maksimum Serapan MDA	39
GambarC.2	: KurvaBaku MDA	40
GambarE.1	: KurvaBaku Profil Protein	46
GambarE.2	: Gel Hasil Elektroforesis Darah.....	47
Gambar F.1	: Sertifikat Kurkumin.....	49
Gambar G.1	: Sertifikat Laik Etik Dari komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel4.1	: Rataan Kadar MDA Jaringan Parotis.....	19
Tabel 4.2	: Berat Molekul Protein.....	23
TabelA.1	: Komposisi Larutan <i>Separating Gel</i> 12%	35
TabelA.2	: Komposisi Larutan <i>Stacking Gel</i> 3%	36
TabelC.1	: Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA	38
TabelC.2	: Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Standar MDA pada $\lambda = 533$ nm.....	40
TabelC.3	: Data absorbansiMDApada $\lambda = 533$ nm.....	41
TabelC.4	: DataKadar MDA.....	42
TabelD.1	: Analisis Ragam Satu Arah Kadar MDA.....	44
Tabel D.2	: Hasil Uji BNT Kadar MDA.....	45
TabelE.1	: Harga Rf dan BM Protein Standar.....	46
TabelE.2	: Berat Molekul Protein Darah.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

LampiranA.	Preparasi Larutan	
A.1	Pembuatan Larutan LPS	30
A.2	Pembuatan Larutan PBS pH 7,4	30
A.3	Pembuatan Larutan Azida 1%.....	30
A.4	Pembuatan Larutan PBS-azida.....	30
A.5	Pembuatan Larutan Formaldehid (PFA) 10%	31
A.6	Pembuatan Larutan NaCl-Fis 0,9%	31
A.7	Pembuatan Larutan PBS-Tween	31
A.8	Pembuatan Larutan PMSF 4 mM	31
A.9	Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl pH 6,5.....	32
A.10	Reagen Uji TBA dan Pembuatan Larutan Kurva Standar MDA	32
A.11	Preparasi Larutan Stok MDA.....	33
A.12	Pembuatan Larutan APS 10%	34
A.13	Pembuatan Larutan T-Akril	34
A.14	Pembuatan Larutan <i>Upper Gel Buffer</i> pH 6,8.....	35
A.15	Pembuatan Larutan <i>Lower Gel Buffer</i> pH 8,8.....	35
A.16	Pembuatan Larutan <i>Running Buffer</i>	35
A.17	Pembuatan Larutan <i>Reducing Sample</i> <i>Buffer</i>	35
A.18	Pembuatan Larutan Pewarna.....	36
A.19	Pembuatan Larutan Penghilang Warna.....	36
LampiranB.	Tahapan Kerja Penelitian	37
LampiranC.	Penentuan Kadar MDA	
C.1	Panjang Gelombang Maksimum MDA.....	38
C.2	Kurva Standar mDA	40
C.3	Data Absorbansi MDA	41
C.4	Perhitungan Kadar MDA	42
LampiranD.	Uji Statistika.....	41
D.1	Perhitungan Faktor Korelasi (FK).....	43

D.2	Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK).....	43
D.3	Perhitungan Kuadrat Tengah (KT)	44
D.4	Perhitungan nilai F.....	44
D.5	Uji BNT 1%	45
Lampiran E.	Profil Pita Protein.....	46
Lampiran F.	Sertifikat Kurkumin	49
Lampiran G.	Serifikat laik Etik Dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang	50

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebersihan mulut mempunyai peran penting di bidang kesehatan gigi, karena kebersihan mulut yang buruk dapat menyuburkan perkembangan bakteri. Rongga mulut dan gigi dapat menjadi tempat asal penyebaran bakteri dan mikroorganisme ke organ lain dalam tubuh manusia sehingga dapat mengakibatkan timbulnya berbagai penyakit baik lokal maupun sistemik. Gingivitis dan periodontitis merupakan faktor risiko bagi penyakit sistemik [1].

Gingivitis merupakan peradangan pada gusi yang terjadi akibat penggosokan yang tidak benar sehingga plak tetap berada di sepanjang gusi. Periodontitis merupakan penyakit mulut dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut, sehingga mengakibatkan kerusakan pada jaringan pendukung gigi. Penelitian menunjukkan bahwa bahaya periodontitis mempengaruhi penyakit seluruh tubuh yang menyangkut fungsi jantung, paru-paru, ginjal, jaringan kelenjar parotis dan organ lainnya yang dapat menyebabkan kematian[2].

Salah satu bakteri yang diduga sebagai penyebab periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis* [3]. Bakteri ini 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. LPS menstimulasi makrofag dan sel endothelium yang berperan penting dalam pelepasan sitokin dan sel-sel radang lain selama proses infeksi. Produk dari tahapan infeksi ini dapat menyebabkan kerusakan organ. Menurut Beumer [4], LPS dapat menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang, seperti *Reactive Oxygen Species (ROS)*.

ROS (Reactive Oxygen Species) dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar yang bersifat sangat toksik, sehingga dapat menimbulkan stres oksidatif. Keadaan stres oksidatif ini mengakibatkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, sampai ke organ tubuh. Sebagai contoh terjadinya proses penuaan dan timbulnya beberapa

penyakit. Beberapa penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas diantaranya adalah stroke, asam, diabetes mellitus, dan AIDS [5]. Kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh ROS ini ditandai dengan diproduksinya senyawa Malondialdehid (MDA) yang berperan sebagai marker kerusakan membran sel [6]. Malondialdehid (MDA) dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas di dalam tubuh [7].

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 sel (antitumor) [8]. 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 paparan lipopolisakarida terhadap kadar malondialdehid (MDA) pada kelenjar parotis tikus putih yang terpapar lipopolisakarida dan mendapatkan terapi kurkumin menggunakan objek teliti yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba. Hal ini sesuai karena tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan spesies ideal untuk uji toksikologi dan memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia [9].

1.2 Perumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh terapi kurkumin terhadap kadar Malondialdehid (MDA) hasil isolasi kelenjar parotis tikus yang terpapar Lipopolisakarida (LPS) ?
2. Bagaimana pengaruh terapi kurkumin terhadap profil protein hasil isolasi darah tikus yang terpapar Lipopolisakarida (LPS)?

1.3. Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*R. norvegicus*) berusia 2 bulan dengan berat badan 100-150 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat

sertifikasi laik etik oleh Komisi Etik (No.116-KEP-UB) Penelitian Universitas Brawijaya.

2. Dosis pemberian Lipopolisakarida (LPS) yang diberikan pada hewan yaitu pemberian dosis 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebanyak 200 μL .
3. Terapi kurkumin yang diberikan pada hewan coba dengan konsentrasi 1% sebanyak 2 mL selama 12 hari.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh terapi kurkumin terhadap kadar Malondialdehid (MDA) hasil isolasi kelenjar parotis tikus yang terpapar Lipopolisakarida (LPS)
2. Mengetahui pengaruh terapi kurkumin terhadap profil protein hasil isolasi darah tikus yang terpapar Lipopolisakarida (LPS)

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan kurkumin dalam memperbaiki kerusakan profil protein darah tikus dan dalam menurunkan kadar MDA yang ditimbulkan akibat paparan lipopolisakarida (LPS).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida (LPS) adalah komponen utama dinding sel bakteri gram negatif dan diketahui dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (*inflammatory*) pada sel makrofag dan sel lainnya. LPS diketahui dapat menstimulasi makrofag dan sel endothelium yang berperan penting dalam pelepasan sitokin dan sel-sel radang lain selama proses infeksi. Produk dari tahapan infeksi ini dapat menyebabkan kerusakan organ [10].

Lipopolisakarida (endotoksin) bakteri gram negatif diperoleh dari dinding sel *Porphyromonas gingivalis* dan sering kali dibebaskan ketika bakteri lisis. Bahan tersebut stabil terhadap panas, mempunyai berat molekul antara 3000 dan 5000 [11]. Menurut Heritage [12], LPS menyusut hingga 40% struktur permukaan dari bakteri gram-negatif, oleh karena itu keberadaannya sangat penting.

LPS terdiri dari 3 struktur, yaitu :

1. Polisakarida yang terdiri dari rantai O
2. Lapisan tengah (inti) yang terdiri dari lapisan luar dan dalam
3. Lapisan lipid A

Lapisan lipid A ini letaknya berdekatan dengan inti polisakarida (*core polysaccharide*) merupakan lapisan terpenting yang berperan dalam toksisitas endotoksin. Pada bakteri gram negatif mempunyai keniripan pada struktur lapisan tengah dan lipid A tetap berbeda pada rantai spesifik O [13].

Menurut Dixon and darveau [14]: Lipid A adalah suatu gula yang berkonfigurasi dengan heksoamin dan didasari oleh fosfolipid, yang bertindak sebagai bagian hidrofobik dari LPS. Lipid pada *E. coli* terdiri atas suatu 1,4'-bifosforilasi $\beta(1'-6)$ berikatan dengan kerangka dasar D-glukosamin disakarida (D-GlcN 1, D-GlcN 2) yang merupakan heksa-asilasi melalui ester primer dan ikatan amida. Dengan disertai pula oleh substitusi kedua pada gugus hidroksil spesifik.

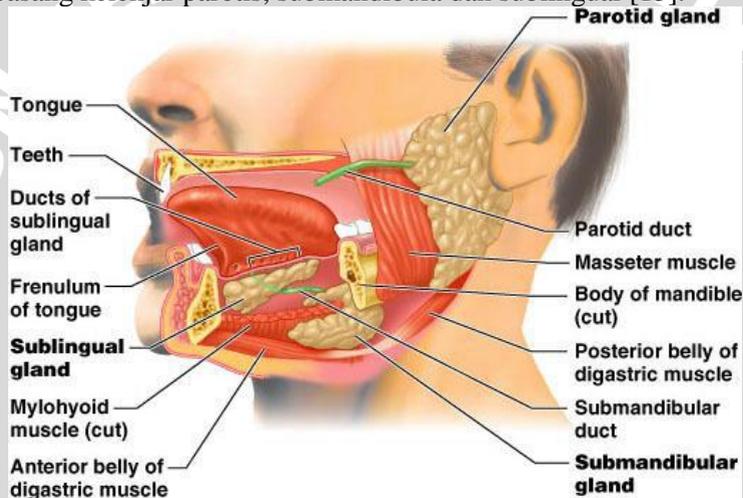
Lipopolisakarida (LPS) dapat berikatan dengan beagam makromolekul seperti albumin, *low-density lipoprotein*, *high-density lipoprotein*, dan *LPS-binding protein* (LBP). LPS dapat menginduksi

produksi dan pelepasan sel-sel radang, seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) [4].

Lipopolisakarida (LPS) bersifat toksik terhadap hewan dan manusia, dan dikenal sebagai endotoksin. Injeksi endotoksin dapat menyebabkan infeksi, yang pada akhirnya menimbulkan kerusakan organ hingga kematian [12].

2.2 Kelenjar Parotis

Manusia memiliki kelenjar saliva yang terbagi menjadi kelenjar saliva mayor dan minor. Kelenjar saliva mayor terdiri dari sepasang kelenjar parotis, submandibula dan sublingual [15].



Gambar 2.1 Kelenjar Parotis

Kelenjar parotis merupakan kelenjar saliva yang terbesar, terletak di regio preaurikula dan berada dalam jaringan subkutis. Kelenjar ini memproduksi sekret yang sebagian besar berasal dari sel-sel asini. Kelenjar parotis terbagi oleh nervus fasialis menjadi kelenjar supraneural dan kelenjar infraneural. Kelenjar supraneural ukurannya lebih besar daripada kelenjar infraneural. Kelenjar parotis terletak pada daerah triangular yang selain kelenjar parotis, terdapat pula pembuluh darah, saraf, kelenjar limfatik [15].

2.3 ROS

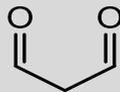
Stres oksidatif merupakan istilah yang digunakan untuk menunjukkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dengan

antioksidan, baik secara enzimatis maupun non-enzimatis. Pada prinsipnya ada dua faktor penyebab penting terjadinya stres oksidatif, yang pertama karena berkurangnya atau tidak adanya antioksidan, baik enzimatis maupun non-enzimatis. Antioksidan enzimatis yang berperan dalam mengurangi ROS dalam tubuh adalah *Superoxide Dismutase* (SOD) dan *glutathion peroksidase* (GSH), sedangkan antioksidan non-enzimatis berasal dari konsumsi diet antioksidan maupun nutrisi penting, dalam hal ini adalah vitamin C dan vitamin E. Faktor penyebab kedua adalah adanya peningkatan ROS baik endogen maupun eksogen[5].

Keadaan stres oksidatif dapat menimbulkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, sampai ke organ tubuh, sebagai contoh terjadinya proses penuaan dan timbulnya beberapa penyakit. Beberapa penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas, mencakup lebih dari 50 jenis penyakit diantaranya adalah stroke, asam, diabetes mellitus, dan AIDS[5]. Bahkan dapat menyebabkan kerusakan hati, jantung, otak, limpa, pankreas, sistem susunan saraf dan ginjal [16]. Hal tersebut dikarenakan radikal bebas adalah suatu atom yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar, sehingga sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, atau DNA sehingga reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya suatu penyakit [17].

2.4 Malondialdehid (MDA)

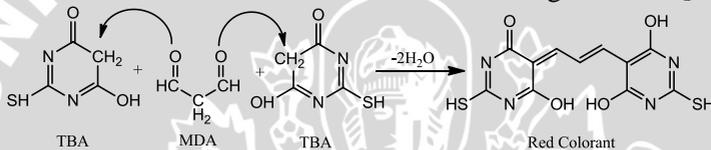
Senyawa radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi asam-asam lemak tidak jenuh dari membran sel. Terjadinya perubahan membran sel mendorong reseptor dan kanal ion mengalami kerusakan, serta tidak berfungsi. Reaksi peroksidasi asam-asam lemak dan kerusakan membran ditandai dengan diproduksinya senyawa MDA, yang berperan sebagai marker kerusakan membran sel [6]. Struktur MDA terlihat seperti pada gambar[18]



Gambar2.2 Struktur MDA

Pengukuran malondialdehid digunakan sebagai suatu indikator pada peroksidasi lipid. Hasil dari peroksidasi lipid tersebut dapat dihubungkan dengan berbagai macam penyakit seperti yang ada di dalam tubuh manusia dan hewan. Peroksidasi lipid adalah suatu sel yang digunakan sebagai indikator pada stres oksidatif dan jaringannya. Peroksidasi lipid diperoleh dari banyaknya ketidakstabilan asam lemak yang dapat terurai menjadi suatu rangkaian campuran kompleksnya, meliputi ikatan karbonil yang reaktif dan kebanyakan terdapat pada malondialdehid [19].

Malondialdehid (MDA) merupakan produk sekunder dari lipid peroksidasi yang akan bereaksi dengan *2-thiobarbituric acid* (TBA) pada suasana asam sehingga akan menghasilkan warna merah. Reaksi antara MDA dan TBA adalah sebagai berikut [20]:



Gambar 2.3 Reaksi pembentukan MDA dengan TBA

2.5 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah proses oksidasi lipid [21].

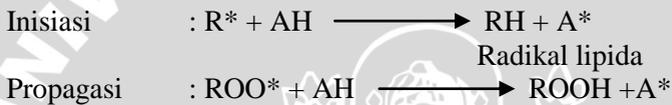
Fungsi utama antioksidan digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensor dan nutrisi. Lipid peroksidasi merupakan salah satu faktor yang cukup berperan dalam kerusakan selama dalam penyimpanan dan pengolahan makanan [22]. Menurut Gordon [23], antioksidan dapat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok, yaitu antioksidan primer yang dapat bereaksi dengan lipid radikal dan membentuk produk stabil, serta antioksidan sekunder yang dapat mengurangi kecepatan inisiasi.

Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi yaitu [23]:

1. Pemberian atom hidrogen

Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama sebagai pemberi atom hidrogen sering disebut sebagai antioksidan primer.

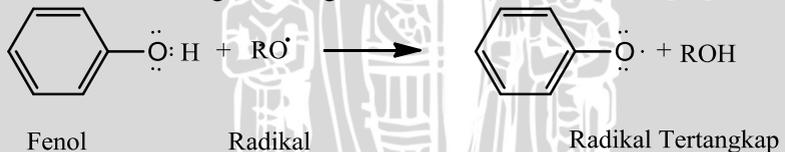
Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibandingkan radikal lipida. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.



Gambar 2.4 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida

2. Memperlambat laju autooksidasi

Mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Berbagai mekanisme di luar pemutusan ikatan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil mampu memperlambat laju autooksidasi [23]. Adapun senyawa fenolik dapat menghambat radikal bebas dengan mekanisme sumbangan hidrogen dan stabilisasi resonansi [24].



Gambar 2.5 Mekanisme transfer hidrogen senyawa fenol

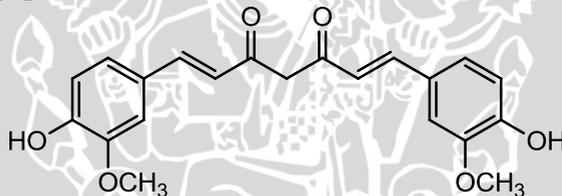
2.6 Kurkumin

Kunyit merupakan salah satu tanaman rempah dan obat. Habitat asli tanaman tersebut meliputi wilayah Asia khususnya Asia Tenggara. Bagian kunyit yang dapat digunakan sebagai obat adalah rimpangnya. Khasiat terbaik dari rimpang kunyit yang digunakan sebagai obat terdapat pada rimpang induk yang warna bagian dalamnya kemerahan dan masih segar. Tanaman kunyit dapat hidup

dengan baik pada suhu yang berkisar antara 20–30 °C dengan curah hujan 1500-2000 mm/tahun. Kunyit biasanya memiliki batang setinggi 1 meter dan memiliki sistem perakaran yang disebut rizoma [25].

Rimpang kunyit mengandung senyawa aktif yang berkhasiat sebagai obat yaitu kurkuminoid, salah satunya adalah kurkumin. Rumus kimia kurkumin adalah $C_{21}H_{20}O_6$ [26]. Kurkumin merupakan zat warna kuning yang terkandung dalam rimpang

Kunyit aneka jenis temu marga zingiberaceae. Kurkumin merupakan senyawa antioksidan karena mampu menangkal radikal bebas yang berperan sebagai indikator reaksi oksidasi. Kemampuan antioksidan yang dimiliki kurkumin mampu melindungi kerusakan sel-sel, dengan meningkatkan pembentukan lendir dalam saluran cerna yang memberikan perlindungan terhadap permukaan saluran pencernaan [27]. Kurkumin juga memiliki aktivitas antibakteri berspektrum luas yaitu antibakteri yang aktif terhadap berbagai jenis bakteri Gram positif dan Gram Gram negatif, antivirus, dan penginduksi apoptosis tosis sel (antitumor) [8].



Gambar 2.6 Struktur kurkumin

2.7 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut [28]:

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Sub filum : Vertebrata
- Klass : Mammalia
- Ordo : Rodentia
- Sub Ordo : Sciurognathi
- Familia : Muridae
- Sub Familia : Murinae

- Genus : *Rattus*
- Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan spesies ideal untuk uji toksikologi [9] dan memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia

2.8 Hipotesis

Pemberian kurkumin secara teratur dapat menurunkan kadar malondialdehid (MDA) pada parotis dan memperbaiki kerusakan protein darah tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) yang telah dipapar lipopolisakarida.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan September-November 2012.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, hewan coba berupa 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 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Lipopolisakarida (*Porphyromonas gingivalis* LPS 2mg/mL serotype 0,55:B5, Sigma Chemical co.). penggunaan hewan coba untuk penelitian ini telah sah dengan mendapat layak etik dari Komisi Etik Universitas Brawijaya Malang.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah Na_2HPO_4 , H_2O , KCl , KH_2PO_4 , NaN_3 1%, Formaldehid 37%, NaCl (MD. Bio Inc.), glisin (MD. Bio Inc), Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{-HCl}$ MD. Bio Inc), Tris Base (Tris-(hydromethyl)-aminomethane, MD. Bio Inc), TCA (Trichloroacetic Acid), NaCl -fis 0,9%, kit MDA (Malondialdehid), TBA (Thiobarbituric Acid), Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF, $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ Bio-Rad Lab.), Etanol absolut 99% ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ Merck.), Acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ MP Biomedicals Inc.), Bis-acrylamide ($\text{C}_2\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$ Bio Basic Inc), β -merkaptotanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_5$ MP Biomedicals Inc.), Ammonium persulphate (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Pharmacia Biotech), N, N, N', N' tetramethyl ethylene diamine (TEMED, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ Pharmacia Biotech), bromophenol blue ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ Merck), commasive brilliant blue R-350 ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$ SIGMA-Aldrich Co. Germany), Tween-20 (Polyxyethylene Sorbitans Monolaurate, Bio-Rad Lab.), dan akuades steril.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas (labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, mikropipet, gelas ukur 100 mL, beaker glass (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL) pengaduk kaca, gelas arloji, tabung reaksi, corong gelas), mortar, rak tabung reaksi, penangas air, stirer, tabung polipropilene, tabung mikro (eppendorf), lemari pendingin, digital pH-meter (inolab-WTW), neraca analitik(Sartorius basic P-160 kepekaan 0,0001 G/160 G), tabung sentrifugasi, shaker, alat sentrifugasi (Denley type-BR 401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), sonikator (Branson 200), spektrofotometer UV-Vis, hot plate, autoklaf elektrik (Gnatus) dan mini 2D elektroforesis protein II (Bio-rad).

3.3 Tahapan Penelitian

Metode percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode percobaan dengan menggunakan rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok pertama bertindak sebagai kontrol kelompok kedua diberi paparan LPS dengan dosis 0,3 µg/mL, kelompok ketiga diberi paparan LPS dengan dosis 0,3 µg/mL dan sekaligus diberi terapi kurkumin 1% sebanyak 2 mL selama 12 hari. Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Preparasi hewan coba (Pemaparan LPS dan pemberian terapi kurkumin)
2. Pengambilan parotis dan darah
3. Isolasi parotis dan darah
4. Pengukuran kadar MDA menggunakan hasil isolasi parotis
5. Penentuan profil protein dari darah dengan tehnik SDS-PAGE
6. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Preparasi hewan coba dilakukan selama dua minggu di Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang . Tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok pertama bertindak sebagai kontrol kelompok kedua diberi paparan LPS dengan dosis $0,3 \mu\text{g/mL}$, kemudian diinkubasi selama 12 hari untuk melihat pengaruh yang diakibatkan oleh paparan Lipopolisakarida (LPS). Kelompok ketiga diberi paparan LPS dengan dosis $0,3 \mu\text{g/mL}$ dan 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.

3.4.2 Pengambilan Parotis dan Darah

3.4.2.1 Pengambilan Parotis

Pengambilan parotis pada hewan coba tikus putih dilakukan pada hari ke-13 setelah diterapi dengan kurkumin. Langkah awal yang harus dilakukan mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut, tikus diletakkan dengan posisi perut di atas pada papan pembedahan. Kemudian diambil bagian parotisnya, diisolasi dan dipotong. Organ parotis mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. Kemudian parotis dibagi menjadi dua. Dimana $\frac{1}{4}$ bagian dimasukkan ke dalam larutan paraformaldehid (PFA) 10% dan $\frac{3}{4}$ bagian dimasukkan ke dalam larutan phosphate buffer saline-azida (PBS-azida) pH 7,4. Setelah itu dilakukan isolasi pada organ parotis.

3.4.2.2 Pengambilan Darah

Pengambilan darah pada hewan coba tikus putih dilakukan pada hari ke-13 setelah diterapi dengan kurkumin. Langkah awal yang harus dilakukan mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut, tikus diletakkan dengan posisi perut di atas pada papan pembedahan. Kemudian darah diambil pada bagian jantung tikus. Setelah itu dilakukan isolasi protein pada darah.

3.4.3 Isolasi Parotis dan Darah

3.4.3.1 Isolasi Parotis

Organ parotis dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambahkan larutan PBS-Tween: PMSF (9:1) sebanyak 1 mL, ditambahkan sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Setelah itu homogenat ditambahkan dengan larutan PBS-Tween: PMSF (9:1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan autoklaf. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatan diambil dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan.

3.4.3.2 Isolasi Protein pada Darah

. Darah yang telah diambil didiamkan sekitar 3-5 jam dalam posisi miring 45° selama 0.5-1 jam. Bila belum terpisah sempurna dapat didiamkan selama 3-5 jam. Darah didiamkan pada temperatur ruang. Setelah darah dan serum terpisah, dilakukan proses pemisahan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum dapat dipisahkan dari darah. Apabila serum masih berwarna merah, dapat dilakukan sentrifugasi kembali. Serum yang didapatkan disimpan pada temperatur -20°C .

3.4.4 Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)

3.4.4.1 Penentuan λ Maksimum MDA

KIT MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil masing-masing 100 μL , dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan 550 μL akuades. Masing-masing tabung yang berisi 600 μL larutan standar ditambahkan 100 μL TCA 100%, 250 μL HCl 1M dan 100 μL Na-thio 1%. Dihomogenkan dengan vorteks. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Diinkubasi dalam penangas air dengan temperatur 100°C selama 30 menit setelah itu didinginkan pada temperatur ruang. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diukur absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 500-600 nm untuk panjang gelombang maksimum MDA.

3.4.4.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji Thiobarbituric Acid (TBA)

Parotis sebanyak 1,8 g dipotong kecil-kecil lalu digerus dalam mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Kemudian ditambahkan 1 mL NaCl 0,9%. Selanjutnya homogenat dipindahkan dalam tabung mikro dan di sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan parotis diambil sebanyak 100 μ L, ditambahkan dengan 550 μ L akuades. Lalu ditambahkan 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-thio. Pada setiap penambahan reagen, larutan dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan diambil dan dipindahkan pada tabung reaksi baru. Selanjutnya larutan diinkubasi dalam penangas dengan 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.

3.4.5 Penentuan Profil Protein dari Darah dengan Tehnik SDS-PAGE

3.4.5.1 Persiapan Gel

Pada persiapan gel langkah pertama yang harus dilakukan adalah disiapkan plat gel dengan cara merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat \pm 1 mm. Gel dibagi menjadi dua jenis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* dibuat dengan komposisi pada tabel A.1. Kemudian dituangkan larutan separating gel dalam plat dengan menggunakan pipet mikro, dituangkan pula akuades steril di atas gel, dan dibiarkan 10-30 menit sehingga gel memadat. Setelah gel mulai terbentuk atau memadat, dibuang akuades steril yang ada di atas gel tersebut. *Stacking gel* dibuat dengan komposisi pada tabel A.2. Kemudian dituangkan larutan stacking gel di atas separating gel yang telah memadat terlebih dahulu dengan pipet mikro. Dipasang sisiran hingga gel memadat dan terbentuk sumuran. Berikutnya setelah gel memadat, sisiran dilepas, plat dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan dalam larutan running buffer pada alat tersebut.

3.4.5.2 Injeksi Sampel dan Running

Hasil isolasi masing-masing diambil 10 μL , ditambahkan 10 μL larutan Tris-HCl dan ditambahkan pula 20 μL reducing sampel buffer (RSB) dan dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Selanjutnya didinginkan dan setelah dingin dimasukkan sampel dalam sumur-sumur gel dengan volume 30 μL setiap sumuran. Salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar yang telah diperlakukan sama seperti sampel sebagai sampel. Selanjutnya dihubungkan anoda dengan reservoir bawah dan katoda dengan reservoir atas. Lalu dihubungkan power supply 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.

3.4.5.3 Perlakuan Setelah Running

Perlakuan setelah running adalah gel hasil running direndam dalam larutan pewarna (staining) dengan dikocok menggunakan shaker selama 30 menit. Selanjutnya direndam gel hasil running tersebut dalam larutan penghilang warna (destaining) dengan dikocok menggunakan shaker hingga pita pada gel tampak jelas.

3.4.5.4 Penentuan Berat Molekul

Dengan cara membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f =(Retardation factor) dari masing-masing pita dimana:

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Nilai R_f yang terhitung ditempatkan sebagai sumbu x dan berat molekul ditempatkan pada sumbu y. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis $y=ax+b$. Dari persamaan ini mobilitas dan berat molekul yang akan dicari diplotkan pada persamaan tersebut sehingga diketahui berat molekulnya.

3.4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari perhitungan kadar MDA dianalisis menggunakan analisis ragam pola rancangan acak lengkap sederhana (RAL) dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. JK total = $\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$

- b. JK perlakuan (JK_p) = $\frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right) \right]^2}{n_1} - FK$

- c. JK galat percobaan (JKG) = JK_{total} - JK_{perlakuan}

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

- a. Kuadrat Tengah perlakuan (KT_p) = $\frac{JK_p}{db_{perlakuan}}$

- b. Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG) = $\frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}}$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

Keterangan: Y_{ij} = Kadar MDA (µg/mL)

p = banyaknya percobaan

n = banyaknya ulangan

5. Menghitung nilai BNT 1%

$$\text{BNT } (\alpha) = t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KTgalat}{n}}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 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 4.1 Rataan Kadar MDA Jaringan Parotis

Perlakuan	Rataan Kadar MDA (μ g/mL)
Sehat	0,801
Terpapar Lipopolisakarida	3,271
Lipopolisakarida + Terapi	2,037

Pada tikus yang terpapar Lipopolisakarida, peningkatan rata-rata kadar MDA sebesar 75% pada jaringan parotis diduga sebagai akibat peningkatan produksi radikal bebas. Lipopolisakarida dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Pada tabel 4.1 terlihat bahwa kadar MDA pada tikus yang terpapar lipopolisakarida memiliki kenaikan yang cukup signifikan. Hasil analisis ini membuktikan bahwa lipopolisakarida memberikan pengaruh negatif pada tikus dengan meningkatnya kadar radikal bebas dalam tubuh. Namun pemberian terapi kurkumin mampu menurunkan jumlah radikal bebas yang terbentuk tersebut..

Berdasarkan data pada tabel 4.1 terlihat bahwa kadar MDA tikus yang terpapar lipopolisakarida dan diberikan terapi kurkumin menurun sebesar 38% dari 3,271 μ g/mL menjadi 2,037 μ g/mL. Penurunan rata-rata kadar MDA jaringan parotis yang terpapar lipopolisakarida tersebut dikarenakan pengaruh kurkumin sebagai antioksidan yang mampu mencegah timbulnya senyawa radikal dan menetralkan senyawa radikal supaya tidak terjadi kerusakan sel-sel dan jaringan parotis.

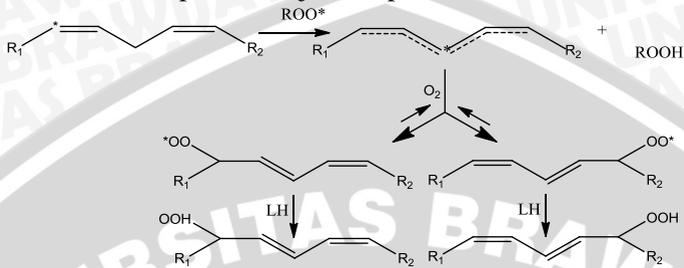
Radikal bebas, termasuk ROS mempunyai peranan penting bagi kesehatan tubuh, khususnya ROS endogen. Dalam keadaan normal, ROS dapat mengurangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan pembuluh darah dan organ organ tubuh lainnya. Namun apabila ROS yang dihasilkan melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan enzimatis (SOD dan GSH), maka akan menimbulkan berbagai penyakit [5]. Maka pada penelitian ini digunakan kurkumin sebagai terapi alternatif untuk menurunkan aktivitas radikal bebas akibat lipopolisakarida dalam tubuh tikus.

Adanya paparan senyawa toksik seperti lipopolisakarida 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.

Mekanisme lipopolisakarida sebagai sumber donor NO eksogen pada akhirnya mampu memicu peningkatan beberapa ROS yakni superoksida (O_2^*), hidroksil (*OH) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal superoksida berubah menjadi hidrogen peroksida yang dikatalisis SOD dan pada akhirnya membentuk radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Radikal hidroksil adalah spesies yang sangat reaktif. Membran sel terdiri dari banyak komponen penting yaitu Fosfolipid, glikolipid (keduanya mengandung asam lemak tak jenuh) dan kolesterol. Asam lemak tak jenuh ini sangat peka terhadap radikal hidroksil. Proses oksidasi asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas disebut dengan peroksidasi lipid.

Kerusakan sel yang dihasilkan oleh peroksidasi lipid pada membran sel dapat berupa terjadinya serangkaian proses imunoinflamasi yang menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskuler. Peroksidasi lipid yang dimulai dari membran, selanjutnya terjadi pemutusan rantai asam lemak menjadi senyawa toksik,

Proses ini menghasilkan suatu produk yaitu senyawa MDA melalui mekanisme reaksi seperti ditunjukkan pada (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Mekanisme reaksi peroksidasi lipid

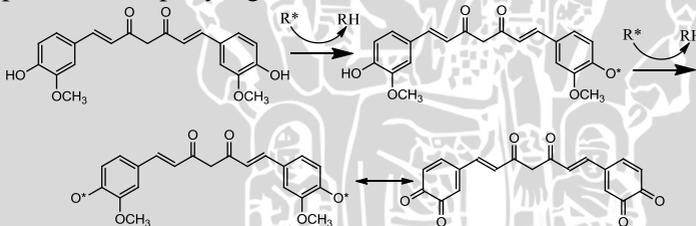
Mekanisme reaksi diawali pada tahap inisiasi yaitu pengambilan atom H dari asam lemak tak jenuh oleh oksigen bebas yang terdapat pada (*OH). Stabilitas bentuk dari produk awal ini ditentukan oleh energi disosiasi ikatan antara C-H. Ikatan ganda metilen pada asam lemak tak jenuh lebih mudah teroksidasi daripada ikatan pada asam lemak jenuh. Selanjutnya pada tahap propagasi, reaksi antara radikal pentadienil dengan atom O₂. Hasil dari reaksi ini akan menginisiasi reaksi dengan asam lemak tak jenuh yang lain sehingga menghasilkan produk baru. Akhirnya pada tahap terminasi, terjadi reaksi kombinasi dua radikal menjadi suatu produk non radikal. Reaksi peroksidasi asam lemak tak jenuh terus berlangsung hingga dihasilkan metabolit sekunder, salah satunya adalah malondialdehid (MDA) Jumlah radikal bebas yang berlebih mengakibatkan peningkatan proses peroksidasi lipid sehingga MDA yang dihasilkan juga meningkat.

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian ekstrak kurkumin sebagai terapi dapat menurunkan kembali kadar MDA pada jaringan Parotis tikus yang terpapar LPS (Tabel 4.1). Dari hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kadar MDA pada tikus yang terpapar LPS dengan tikus yang mendapat terapi. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang mendapat terapi dengan dosis 200 µL dapat menurunkan kadar MDA hingga 38%.

Kemampuan ekstrak kurkumin dalam menghambat peroksidasi lipid dan menurunkan kadar MDA disebabkan adanya

senyawa-senyawa bahan alam yang terkandung di dalamnya. Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid kemungkinan melibatkan senyawa yang mampu menangkal radikal bebas. Salah satu senyawa yang diduga berperan dalam penghambatan peroksidasi lipid karena terkait dengan kemampuan senyawa tersebut dalam menangkap radikal bebas adalah senyawa polifenol, terutama senyawa flavonoid dan kurkumin yang paling banyak terkandung dalam *Curcuma sp.* Reaksi penghambatan radikal bebas oleh senyawa kurkumin diperlihatkan pada (Gambar 4.2).

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 mendistribusikan 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 maupun flavonoid dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinisiasi oleh radikal bebas.

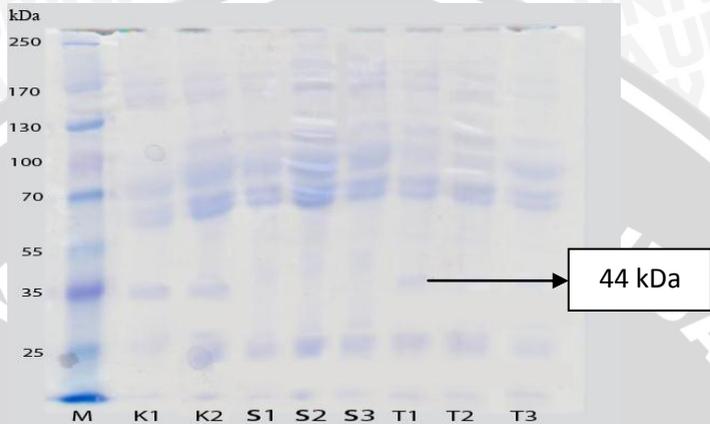


Gambar 4.2. Reaksi penghambatan radikal bebas oleh senyawa kurkumin

4.2 Efek Terapi Kurkumin Terhadap Profil Protein Darah Tikus yang Terpapar Lipopolisakarida

Stres oksidatif adalah terjadinya ketidakseimbangan atau penurunan aktivitas antioksidan enzimatis, dalam hal ini adalah Glutathion peroksidase (GSH) dan Superoksida dismutase (SOD). Sebagai akibatnya akan terbentuk berbagai senyawa radikal yang berpotensi dalam merusak beberapa protein dalam darah tikus. Pada penelitian ini, lipopolisakarida merupakan pemicu terjadinya

beberapa kerusakan pita protein pada darah tikus. Kerusakan pita protein dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Gel hasil elektroforesis darah

Keterangan :

- M = Marker
- K = Kontrol/ sehat
- S = Sakit
- T = Terapi

Tabel 4.2. Berat molekul protein

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

Tabel 4.2 menunjukkan perbandingan kondisi kerusakan protein darah tikus yang terpapar lipopolisakarida dengan tikus yang mendapatkan terapi kurkumin. Dari gambar terlihat bahwa pita-pita protein tikus yang terpapar lipopolisakarida (Tabel 4.2 S) mengalami kerusakan sel dibandingkan dengan pita protein tikus yang telah mendapatkan terapi kurkumin (Tabel 4.2.T). Terlihat bahwa ada beberapa protein yang hilang (44 kDa), hal ini dikarenakan LPS

dapat berikatan dengan beragam makromolekul diantaranya LPS-*Binding Protein* (LBP). LBP merupakan sel-sel epitel dari saluran pencernaan serta berada normal pada serum yang mempunyai gugus yang bersifat nukleofilik dengan ujung NH_3^+ 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 [5].

Proses pelekatan LPS dan LBP melibatkan komponen lipid A dari LPS yang mengandung gugus dihidrogen fosfat (H_2PO_4) dengan gugus ammonium positif (NH_3^+) yang berasal dari LBP. Dimana dihidrogen fosfat (H_2PO_4) ketika berada di dalam sel yang memiliki pH 6-7 akan terhidrolisis dan kehilangan satu atom hidrogen (H^+) menjadi hidrogen fosfat (HPO_4^-). Hilangnya satu atom tersebut menyebabkan salah satu atom oksigen LPS akan bermuatan negatif (O^-). Sehingga atom O^- cenderung akan berikatan dengan gugus ammonium positif (NH_3^+) yang berasal dari ujung akhir LBP untuk menstabilkan strukturnya. Dari reaksi tersebut, dapat membentuk kompleks baru, yaitu LPS-LBP. Dimana kompleks tersebut dapat menstimulasi produksi sel-sel radang dan bertanggung jawab atas rusaknya beberapa sel di dalam tubuh. Berikut ini mekanisme reaksi yang terjadi :



Gambar 4.4 Mekanisme Reaksi Pembentukan Kompleks LPS-LBP

Sedangkan pada (Tabel 4.2.T) menunjukkan bahwa profil pita protein pada tikus yang mengalami paparan lipopolisakarida mengalami perbaikan kembali. Perbaikan tersebut terletak pada pita protein dengan berat molekul 44 kDa. Pita protein yang muncul kembali tersebut mendekati pita protein pada tikus kontrol. Hal ini membuktikan bahwa kurkumin dapat berfungsi sebagai antioksidan yang mampu memperbaiki kerusakan protein pada darah tikus akibat paparan lipopolisakarida.

BAB V

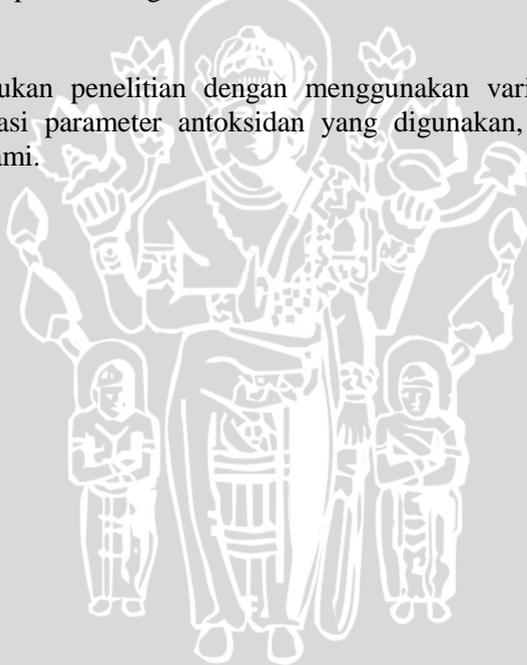
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 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.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian dengan menggunakan variasi dosis LPS dan variasi parameter antioksidan yang digunakan, terutama antioksidan alami.



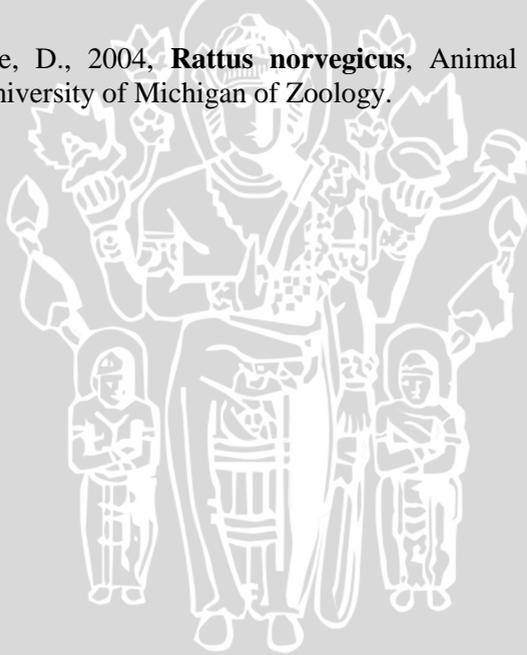
DAFTAR PUSTAKA

- [1] Gurenlian, J. R., 2007, **The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health**, Special supplement: 4-12.
- [2] Aiache, J. M., J. Ph. Devissaguet, and M. M. Guyot-Hermann, 1993, **Farmasetika 2: Biofarmasi**, Airlangga University Press, Surabaya.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Hudgson, E., 2004, **A Text Book Of Modern Toxicology**, Three Edition, Willey-Interscience, A John Willey & Sons Inc. Publication. P. 263-269
- [6] Mahdi, C., 2010, **Bahaya Makanan Berformalin dan Cara Mengatasinya**, *Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Bidang Ilmu Biokimia*, Universitas Brawijaya, Malang.
- [7] 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.

- [8] Bermawie, N., 2006, **Mengatasi Demam Berdarah dengan Tanaman Obat**, Warta penelitian dan Pengembangan Pertanian 28: 6-8.
- [9] Kusumawati, D., 2004, **Bersahabat Dengan Hewan Coba**, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- [10] Stone, W. L., Min Qui, Milton S, 2003, **Lipopolisaccharide Enhances The Cytotoxicity Of 2-Chloroethyl Ethylsulfide**, BMC Cell Biology 4:1.
- [11] Geo, F. Butel, Morse, A. S, 2001, **Mikrobiologi kedokteran**, Penerbit Salemba medika, Jakarta.
- [12] Heritage, J., E.G.V. Evans, R.a. Killington, 1996, **Introduction Microbiology**. Cambridge University Press, United Kingdom.
- [13] Widodo, D, 2006, **Penanganan Sepsis**, Subbagian Penyakit Tropik Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia / RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta.
- [14] Dixon, D.R., and Darveau R. P, 2005, **Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate Host Responses to Bacterial Modification of Lipid A Structure**, J Dent Res 84(7):584-595.
- [15] Al-Abri, R., Marshal F., 2010, **Sialoendoscopy In the Old Patients: A New Tool Or Revolution**; 1:95-8.
- [16] Anonim, 2009, **Kenali Zat Kimia Berbahaya**, Fakultas Teknologi Pangan, Unisri, Solo

- [17] Seidenberg, J. M., D. G. Anderson & R. A. Becker, 1986, **Validation Of an In Vivo Developmental Toxicity Screen In The Mouse**, *Teratol. Carcinogen. Mutagen.* 6:361-374
- [18] Purboyo, A., 2009, **Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*) pada Kelinci yang Dibebani Glukosa**, *Skripsi Fakultas Farmasi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- [19] Abdullah, N.; Nur Zakiah M.; Hazlin Abu H.; Siti Balkis B.; Sazlina K.; 2004, **Protective Effect of the Ethanol Extract of Zingiber Officinale Roscoe on Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Rats**, *Jurnal Sains Kesehatan*, Malaysia.
- [20] Cretu, Romica and Gheorghe Zgherea, 2006, **The Modifications Of Some Physico-Chemical Parameters Of Margarine During Storage**, University “Dunarea de Jos” of Galapi, Romania.
- [21] Ardiansyah, 2007, **Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan**, www.chapteraslamicpace.wordpress.com, diakses tanggal / 2012/ 08/ 25.
- [22] Hermani, R.M., 2005, **Tanaman Berkhasiat Antioksidan**. Penebar Swadaya, Jakarta.
- [23] Gordon, M. H., 1990, **The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro**, In Hudson, B. J. F. (ed.) *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London.
- [24] Fessenden, R. J., dan Fessenden, J.S., 1986, **Kimia Organik I**, Alih Bahasa : A. H. Pudjaatmaka, Edisi Kedua, Erlangga, Jakarta

- [25] Kloppenburgh, 2006, **Tanaman Berkhasiat Indonesia**, Penerjemah: Soegiri J., IPB, Bogor.
- [26] Rahman, M. N., 2009, **Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Biotransformasi Kurkumin Oleh Mikrob Endofit Asal Kunyit**, *Skripsi*, FMIPA IPB, Bogor.
- [27] Djumadi, 2008, **Pengaruh Pemberian Insektisida Diazinon dan Kurkumin Kunyit (*Curcuma domestica*) Per-Oral Terhadap Perubahan Struktur Histologis Duodenum Mencit (*Mus musculus*)**, Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- [28] Armitage, D., 2004, ***Rattus norvegicus***, Animal Diversity Web, University of Michigan of Zoology.



LAMPIRAN

Lampiran A. Preparasi Larutan

A.1 Pembuatan Larutan Lipopolisakarida (LPS)

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. (100 \mu\text{g/mL}) = 1 \text{ mL} \times 0,3 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 3 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$\text{Volume LPS} = \frac{0,3}{100} \times 1 \text{ mL}$$

$$= 3 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$= 3 \mu\text{L}$$

Satu vial LPS (100 $\mu\text{g/mL}$) ditambahkan dengan 1000 μL PBS steril kemudian dipipet sebanyak 3 μL lalu diencerkan dengan PBS steril sampai 1 mL dan digunakan untuk paparan pada tikus putih dengan cara disuntikkan.

A.2 Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

Tahapan yang harus dilakukan adalah menimbang KCl sebanyak 0,2 gram, KH_2PO_4 0,2 gram, NaCl 8 gram dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,16 gram. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan 250 mL akuades steril menggunakan pengaduk magnetik stirer dalam gelas kimia 500 mL dan diatur pH nya hingga mencapai 7,4 dengan pH meter. Setelah itu dipindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

A.3 Pembuatan Larutan Azida (NaN_3) 1%

Ditimbang NaN_3 yang diperlukan dengan perhitungan :

$$\text{NaN}_3 1\% = 1 \text{ gram} / 100 \text{ mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$= 0,1 \text{ gram}$$

Setelah itu dilarutkan dengan akuades steril dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

A.4 Pembuatan Larutan PBS-azida

Tahap yang harus dilakukan adalah diambil 1000 mL larutan PBS pH 7,4. Kemudian ditambah 32 tetes larutan azida dengan

menggunakan pipet tetes lalu dihomogenkan dengan pengaduk magnetik.

A.5 Pembuatan Larutan Formaldehid 10%

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\37\% \cdot V_1 &= 10\% \cdot 500 \text{ mL} \\V_1 &= 135,14 \text{ mL}\end{aligned}$$

Perhitungan di atas untuk membuat formaldehid 10% diambil 135,14 mL dari larutan stok formalin 37%. Setelah itu dimasukkan dalam labu ukur 500 mL. Kemudian ditambah NaCl-Fis 0,9% sampai tanda batas.

A.6 Pembuatan larutan NaCl-fis 0,9%

Tahap yang harus dilakukan adalah menimbang NaCl dengan perhitungan yaitu :

$$\text{NaCl-Fis } 0,9\% = \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 500 \text{ mL}$$

NaCl dilarutkan dengan akuades steril dalam gelas kimia 250 mL dan dipindahkan kedalam labu ukur 500 mL ditambah akuades hingga tanda batas.

A.7 Pembuatan Larutan PBS-Tween

Diambil 200 mL larutan PBS pH 7,4 dalam gelas kimia 250 mL. Kemudian ditambahkan 1 tetes larutan tween dengan menggunakan pipet tetes. Lalu dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetik stirer.

A.8 Pembuatan Larutan Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) 4 mM

Untuk membuat larutan PMSF 4 mM (BM PMSF = 174,2 g/mol), maka:

$$\begin{aligned}a &= 174,2 \text{ g/mol} \times 0,004 \text{ mol/L} \\&= 0,6968 \text{ g/L}\end{aligned}$$

Untuk 100 mL, PMSF yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat PMSF} &= 0,6968 \text{ g/L} \times 0,1 \text{ L} \\&= 0,06968 \text{ g}\end{aligned}$$

PMSF sebanyak 0,06968 g dilarutkan dalam 50 mL akuades steril, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

A.9 Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl pH 6,5

Untuk membuat larutan Buffer Tris-HCl 0,02 M pH 6,5 (BM Buffer Tris-HCl = 157,56 g/ mol), maka:

$$\begin{aligned} a &= 157,56 \text{ g/ mol} \times 0,02 \text{ mol/L} \\ &= 3,1512 \text{ g/L} \end{aligned}$$

Untuk 100 mL, PMSF yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned} \text{Berat PMSF} &= 3,1512 \text{ g/L} \times 0,2 \text{ L} \\ &= 0,63024 \text{ g} \end{aligned}$$

PMSF sebanyak 0,63024 g dilarutkan dalam 100 ml akuades steril dan diatur pH hingga 6,5 dan ditambahkan kembali akuades steril hingga volumenya mencapai 200 mL.

A.10 Reagen Untuk Uji Thiobarbituric Acid (TBA) dan Pembuatan Larutan Kurva Standar MDA

1. TCA (*Trichloroacetic acid*) 100 μL
2. HCl 1 N 200 μL
3. Na-Thiobarbituric 1 % 100 μL
4. NaCl 0,9 % 5 mL

Cara membuat :

1. TCA untuk 100 mL
Ditimbang TCA sebanyak 10 g dan dilarutkan dalam aquabides. Kemudian diencerkan dalam labu ukur 100 mL.

2. HCl 1 N untuk 100 mL

$$N = M e$$

$$\text{Mol} = M \times V$$

$$= 1 \times V = 0,1$$

$$\text{Berat} = \text{mol} \times \text{BM}$$

$$= 0,1 \text{ mol} \times 36,5 \text{ g/mol} = 3,65 \text{ g}$$

$$\rho = 1,268 \text{ g/mL}$$

$$V = \frac{3,65 \text{ g}}{1,268 \text{ g/mL}} = 2,878 \text{ mL}$$

$$V = \frac{100}{37} \times 2,878 = 7,780 \text{ mL}$$

Dipipet 7,780 mL atau 7,780 μ L HCl 37 % dengan mikropipet, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

3. Na-Thiobarbituric untuk 100 mL
Ditimbang 0,868 g Thiobarbituric acid dan 0,241 g NaOH. Kemudian dilarutkan dalam aquabidest dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL.
4. NaCl 0,9 % (b/v) untuk 100 mL
Ditimbang 0,9 g NaCl, kemudian dilarutkan dalam akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL.

A.11 Preparasi Larutan Stok MDA

Stok kit MDA: densitas 0,997 g/mL
 $= 0,997 \cdot 103 \mu\text{g/mL}$

Stok larutan MDA konsentrasi 8 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
$$V_1 \times 0,997 \cdot 103 \mu\text{g/mL} = 8 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V_1 = 0,08 \text{ mL} = 80 \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 80 μ L dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 7 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
$$V_1 \times 8 \mu\text{g/mL} = 7 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V_1 = 8,75 \text{ mL} = 8750 \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 8750 μ L dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 6 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
$$V_1 \times 7 \mu\text{g/mL} = 6 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V_1 = 8,571 \text{ mL} = 8571 \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 8571 μ L dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
$$V_1 \times 6 \mu\text{g/mL} = 5 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,333 \text{ mL} = 8333 \text{ } \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 8333 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL} = 8000 \text{ } \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 8000 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 3 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 4 \text{ } \mu\text{g/mL} = 3 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 7,5 \text{ mL} = 7500 \text{ } \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 7500 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 3 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL} = 5000 \text{ } \mu\text{L}$$

Diambil larutan stok kit MDA sebanyak 5000 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

A.12 Pembuatan Larutan APS 10 %

Larutan APS 10% dibuat dengan ditimbang 0,5 gram ammonium persulphate dan dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Kemudian, dihomogenkan dengan vorteks serta disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

A.13 Pembuatan Larutan Poliakrilamida (T-Akrlil)

Langkah awal yang harus dilakukan adalah ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,0801 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dengan 7 mL akuades steril dengan dihomogenkan menggunakan magnetik stirer. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

A.14 Pembuatan Larutan *Upper Gel Buffer* pH 6,8

Larutan UGB dapat dibuat dengan mula-mula menimbang 0,75 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8. Selanjutnya, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

A.15 Pembuatan Larutan *Lower Gel Buffer* pH 8,8

Tahapan yang harus dilakukan pertama kali adalah menimbang 1,32 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, lalu dilarutkan dengan 5 mL akuades steril dengan dihomogenkan dengan magnetik stirer serta diatur pHnya hingga 8,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

A.16 Pembuatan Larutan *Running Buffer*

Larutan *Running Buffer* dibuat dengan mula-mula menimbang 3,03 gram Tris-base, 14,40 gram glisin dan 1,00 g SDS, lalu dilarutkan dalam 1 L akuades steril.

A.17 Pembuatan Larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB)

Mula-mula diambil dengan mikropipet 0,125 μL UGB, 0,2 μL gliserol, 0,2 μL SDS, 0,05 μL β -merkaptotanol dan 0,025 μL Bromophenol Blue, lalu diencerkan dengan 400 μL akuades steril.

Tabel A.1 Komposisi Larutan *Separating Gel* 12% (1 plate)

Bahan	Volume (μL)
LGB	1300
T-akril	2000
dd H ₂ O	1700
APS 10%	70
TEMED	7

Tabel A.2 Komposisi Larutan *Stacking Gel* 3% (1 plate)

Bahan	Volume (μL)
UGB	415
T-akril	267
dd H ₂ O	975
APS 10%	20
TEMED	2

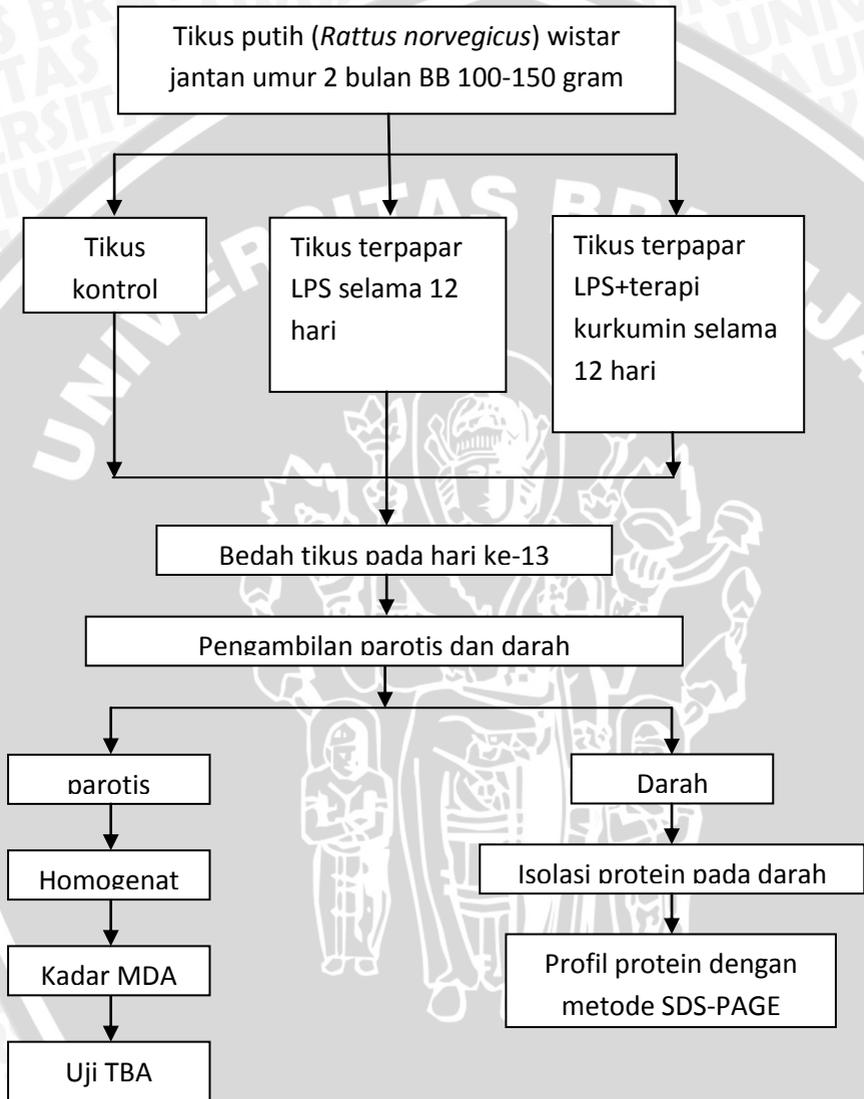
A.18 Pembuatan Larutan Pewarna (*Staining*)

Langkah awal yang harus dilakukan adalah ditimbang 0,2501 gram Commasive Brilliant Blue R-250, dilarutkan dengan 45,4 mL metanol 99,9% dan 9,2 mL asam asetat glasial. Lalu ditambah dengan akuades steril hingga volumenya mencapai 100 mL.

A.19 Pembuatan Larutan Panghilang Warna (*Destaining*)

Larutan *Destaining* dapat dibuat dengan terlebih dahulu dipipet 7 mL asam asetat glasial dan 7 mL metanol 99,9%, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

LampiranB. Tahapan Kerja Penelitian

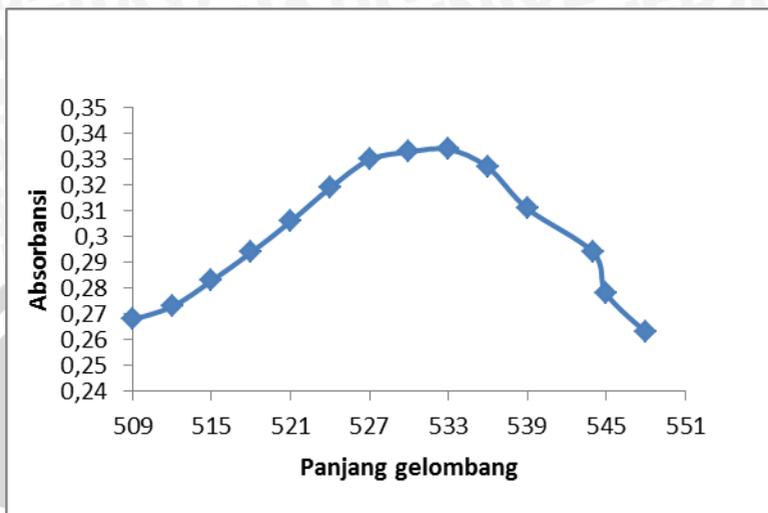


Lampiran C. Penentuan Kadar MDA

C.1 Panjang Gelombang Maksimum MDA

Tabel C.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
500	0,259	548	0,263
503	0,261	551	0,251
506	0,264	554	0,243
509	0,268	557	0,237
213	0,273	560	0,233
515	0,283	563	0,231
518	0,294	566	0,229
521	0,306	569	0,229
524	0,319	572	0,228
527	0,330	575	0,228
530	0,333	578	0,227
533	0,334	581	0,227
536	0,327	584	0,227
539	0,311	587	0,227
542	0,294	590	0,227
545	0,278		



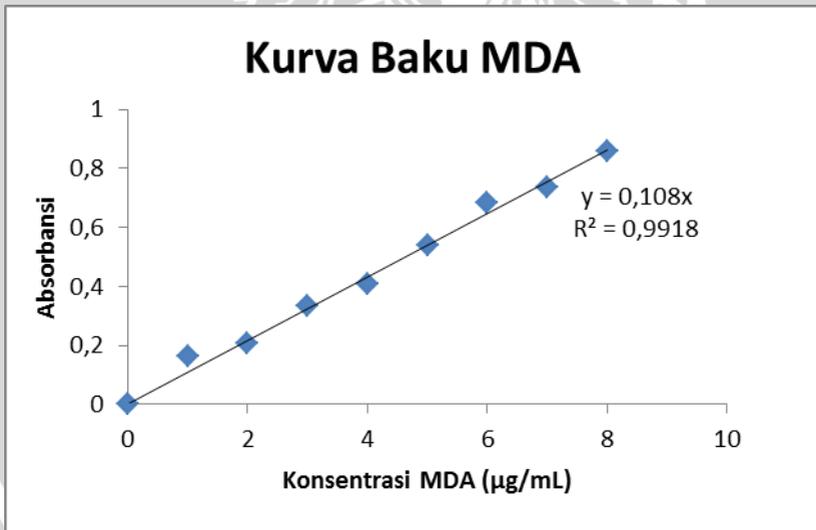
Gambar C.1 Kurva panjang gelombang maksimum serapan MDA



C.2 Kurva standar MDA

Tabel C.2 Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Standar MDA pada $\lambda = 533 \text{ nm}$

Konsentrasi MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0,000
1	0,165
2	0,202
3	0,333
4	0,408
5	0,540
6	0,682
7	0,738
8	0,858



Gambar C.2 Kurva Baku MDA

C.3 Data Absorbansi MDA

Tabel C.3 Data absorbansi MDA pada $\lambda = 533 \text{ nm}$

Perlakuan	A1	A2	A3	A rata-rata
Sehat1	0,085	0,089	0,093	0,089
Sehat 2	0,085	0,085	0,086	0,085
Sehat 3	0,087	0,088	0,087	0,087
Sehat 4	0,085	0,085	0,085	0,085
Sakit 1	0,355	0,359	0,347	0,353
Sakit 2	0,362	0,369	0,352	0,361
Sakit 3	0,350	0,351	0,346	0,349
Sakit 4	0,360	0,353	0,337	0,350
Terapi 1	0,220	0,220	0,222	0,221
Terapi 2	0,230	0,220	0,204	0,218
Terapi 3	0,220	0,225	0,209	0,217
Terapi 4	0,225	0,227	0,220	0,224

C.4 Perhitungan Kadar MDA

Tabel C.4 Data kadar MDA

Kelompok Tikus	Ulangan (Kadar MDA)				Jumlah	Rata-rata
	1	2	3	4		
Sehat	0,824	0,787	0,806	0,787	3,204	0,801±0,177
Sakit	3,269	3,343	3,231	3,241	13,084	3,271±0,506
Terapi	2,046	2,019	2,009	2,074	8,148	2,037±0,292

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA $y = 0,108x$ sehingga dapat dihitung kadar MDA sebagai nilai x . Misalnya pada kelompok sehat tikus 1 memiliki rata-rata nilai absorbansi sebesar 0,801

$$\begin{aligned}y &= 0,108x \\0,801 &= 0,108x \\x &= 0,824\end{aligned}$$

Perhitungan persentase kenaikan atau penurunan kadar MDA:

- Kenaikan kadar MDA akibat paparan LPS
Persen kadar MDA = $\frac{3,271 - 0,801}{3,271} \times 100\%$
= 75%
- Penurunan kadar MDA akibat terapi kurkumin
Persen kadar MDA = $\frac{3,271 - 2,037}{3,271} \times 100\%$
= 38%

Lampiran D. Uji Statistika

D.1 Perhitungan Faktor Korelasi (FK)

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np} \\ &= \frac{(3,204 + 13,084 + 8,148)^2}{3 \times 4} \\ &= \frac{597,118}{12} \\ &= 49,7598 \end{aligned}$$

D.2 Perhitungan jumlah kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{a. JK total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (0,824^2 + 0,787^2 + \dots + 2,074^2) - 49,7598 \\ &= 61,9728 - 49,7598 \\ &= 12,213 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK perlakuan (JK}_p) &= \left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - \text{FK} \\ &= \frac{(3,204^2 + 13,084^2 + 8,148^2)}{4} - 49,7598 \\ &= 61,9616 - 49,7598 \\ &= 12,202 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK galat percobaan (JKG)} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\ &= 12,213 - 12,202 \\ &= 1,1 \times 10^{-2} \end{aligned}$$

D.3 Perhitungan kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$a. \text{ Kuadrat Tengah perlakuan (KT}_p\text{)} = \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}} = \frac{12,202}{2} = 6,101$$

$$b. \text{ Kuadrat Tengah galat percobaan (KTG)} = \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}} = \frac{1,2 \times 10^{-2}}{9} = 1 \times 10^{-3}$$

D.4 Perhitungan nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KT_p}{KT_G} = \frac{6,101}{1 \times 10^{-3}} = 4906,014$$

$$F_{\text{tabel}}(0,01 ; 2 ; 9) = 8,02$$

Keterangan: Y_{ij} = Kadar MDA
 p = banyaknya percobaan
 n = banyaknya ulangan

Tabel D.1 Analisis ragam satu arah kadar MDA

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} (0,01)
Perlakuan	2	12,201	3,05	4906,014	8,02
Galat	9	1,2 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻³		
Total	11	12,213	3,05		

Berdasarkan perhitungan, dapat diketahui nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Pemberian terapi kurkumin terhadap tikus putih mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar MDA.

D.5 Uji BNT 1%

$$BNT (\alpha) = t_{dbs}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KTgalat}{n}}$$

$$\begin{aligned} BNT (0,01) &= t_9^{0,01/2} \sqrt{\frac{2(0,001)}{4}} \\ &= 3,250 \times 0,025 \\ &= 0,081 \end{aligned}$$

Jika nilai lebih kecil atau sama dengan nilai uji BNT 1 % yaitu 0,081, maka perlakuan tersebut tidak memberikan beda yang nyata. Hal ini dilakukan dengan pemberian notasi yang sama. Jika apabila hasil nilai uji memiliki nilai yang lebih besar dari uji BNT 1%. Hal ini memberikan beda yang sangat nyata yang ditunjukkan dengan pemberian notasi (*).

Tabel D.2 Hasil uji BNT kadar MDA

Kadar MDA rata-rata		Sehat	Sakit	Terapi
		0,801	3,271	2,037
Sehat	0,801	-	2,47*	1,24*
Sakit	3,271		-	2,04*
Terapi	2,037			-

Lampiran E. Profil Pita Protein

Tabel E.1 Harga Rf dan Berat Molekul (BM) Protein Standar

A	B	Rf	BM	Log BM
0,8	6	0,133	250	2,39
1,7	6	0,283	170	2,23
2,5	6	0,417	130	2,11
3,3	6	0,55	100	2,00
3,9	6	0,65	70	1,84
4,5	6	0,75	55	1,74
5,1	6	0,81	35	1,54
5,6	6	0,93	25	1,39

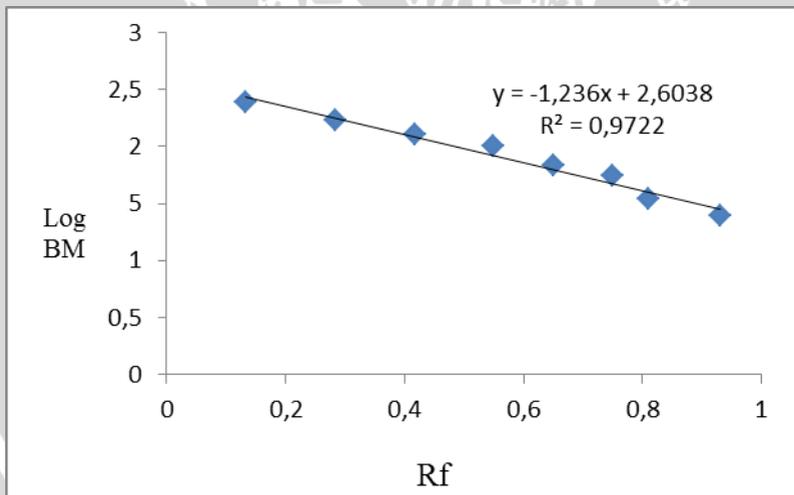
Keterangan:

A = Jarak pergerakan protein dari tempat awal

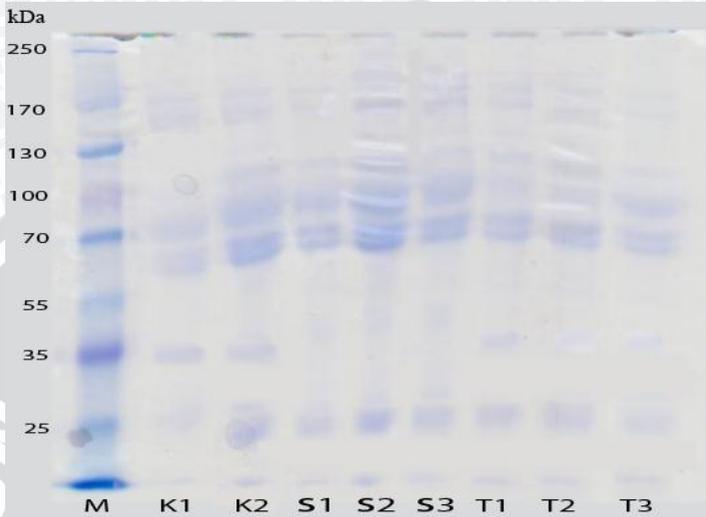
B = Jarak pergerakan warna

Rf = Retardation factor

BM = Berat molekul



Gambar E.1 Kurva baku profil protein



Gambar E.2 Gel hasil elektroforesis darah

Keterangan:

- M = Marker
- K = Kontrol/ sehat
- S = Sakit
- T = Terapi

Tabel E.2 Berat molekul protein darah

Sampel	Pita ke-	A	B	Rf	Log BM	BM (kDa)
Sehat	1	1	6	0,17	2,39	245
	2	1,2	6	0,2	2,35	223
	3	3	6	0,5	1,95	89
	4	3,5	6	0,58	1,88	76
	5	4	6	0,67	1,77	59
	6	4,7	6	0,78	1,64	44
	7	5,1	6	0,85	1,55	35
	8	5,3	6	0,88	1,51	32
Sakit	1	1	6	0,17	2,39	245
	2	1,2	6	0,2	2,35	223
	3	3	6	0,5	1,95	89
	4	3,5	6	0,58	1,88	76
	5	4	6	0,67	1,77	59
	6	5,1	6	0,85	1,55	35
	7	5,3	6	0,88	1,51	32
Terapi	1	1	6	0,17	2,39	245
	2	1,2	6	0,2	2,35	223
	3	3	6	0,5	1,95	89
	4	3,5	6	0,58	1,88	76
	5	4	6	0,67	1,77	59
	6	4,7	6	0,78	1,64	44
	7	5,1	6	0,85	1,55	35
	8	5,3	6	0,88	1,51	32

Lampiran F. Sertifikat Kurkumin

Bio F 西安博孚生物科技有限公司
XI'AN BIOF BIOTECHNOLOGY CO., LTD

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	Curcumin	
Lot Number	BIOF110608	
Lot Quantity	500kg	
Date of Analysis	June. 08, 2011	
Expiry	June. 08, 2013	
Storage	Cool and dry	
Assay	HPLC	

ANALYSIS:

Item	Standard	Result
Content	90%	90.15%
Appearance	Orange yellow powder	Conform
Particle size	80-100	Conform
Identification	Positive	Conform
Solubility	Soluble in ethyl alcohol	Conform
Loss on drying	5.0% Max	3.11%
Residue on ignition	5.0% Max	3.22%
Heavy Metals(Pb, Hg)	10ppm Max	Conform
As	2ppm Max	Conform
Solvents Residue	Negative	Conform
Total of bacteria	1000cfu/g Max	Conform
Fungi	100cfu/g Max	Conform
Pesticides	Negative	Conform
Salmonella	Negative	Conform
E. Coll	Negative	Conform

Quality Control: Yang xiaoming

ADD: Room 1-1111, High-tech Venture Park, No.69 Jinye road,
Gaoxin District of xi'an, P.R China
Tel: 86-29-88447187 Fax: 86-29-88447187
E-mail:nancy_wang@xabiolf.com

Gambar F.1 Sertifikat Kurkumin

Lampiran G. Sertifikat Laik Etik Dari Komisi Etik Universitas Brawijaya



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 116-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

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

PENELITI : RIZKY PRAYOGA D

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : S-1/KIMIA/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 22 Desember 2012
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya


Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Gambar G.1 Sertifikat Laik Etik Dari Komisi Etik Universitas Brawijaya

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

