

## KEMAMPUAN EKSTRAK TEMUMANGGA (*Curcuma mangga*) DALAM MENGHAMBAT PROSES OKSIDASI LOW DENSITY LIPOPROTEIN

(*Extract of Curcuminoid Temumanangga (Curcuma mangga) in Inhibition Oxidation Reaction of Low Density Lipoprotein by Macrophage*)

Trini Susmiati<sup>1)</sup>, Sulistiyani<sup>2)</sup>, Dondin Sajuthi<sup>2)</sup>, dan Latifah K. Darusman<sup>3)</sup>

### ABSTRACT

The oxidation of low-density lipoprotein (LDL) is believed to be the initiating factor for the development and progression of atherosclerosis. Curcuminoid, the metabolite of Zingiberaceae family such as temu mangga (*Curcuma mangga*), has been shown to reduce the susceptibility of LDL to oxidation. In this study, we examined the effect of curcuminoid extracted from temu mangga on copper ion-induced lipid peroxidation of low density lipoprotein (LDL) in mice's macrophages and *Macaca nemestrina*'s monocytes. Analyses were done by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) as malonaldehyde (MDA). LDL were harvested and isolated from 5 adult female *Macaca fascicularis* fed atherogenic diet for 3 months. LDL oxidation by mice macrophage incubated for 4 hours were inhibited by curcuminoid at concentration of 8 ppm. There was decreased 17% ( $P < 0.01$ ) in the concentration of MDA compared to control without curcuminoid ( $31.99^B \pm 0.9$  vs  $36.77^A \pm 0.9$  nmol/mg protein LDL, respectively). Inhibition of LDL oxidation in *M. nemestrina* macrophage were highest by curcuminoid at 8 ppm for 4 hours and 6 hours incubation. There was 14.8% and 23% inhibition ( $P < 0.01$ ) ( $23.768 \pm 0.095^A$  vs  $27.111^B \pm 0.972$  and  $23.37^B \pm 0.12$  vs  $30.87^A \pm 2.49$  nmol/mg LDL protein, respectively). These data suggest that curcuminoid of temu mangga were able to inhibit LDL oxidation in the cellular level, therefore offer protection against oxidation of LDL.

**Key words:** LDL, atherosclerosis, curcuminoid, *Curcuma mangga*

### PENDAHULUAN

Aterosklerosis merupakan penyakit yang berhubungan dengan sistem pembuluh darah besar dan pembuluh darah kecil. Peroksidasi lipid disinyalir sebagai penyebab awal dalam patogenesis aterosklerosis. Aterosklerosis diindikasikan dengan adanya sel busa yang terbentuk akibat makrofag mengambil *low density lipoprotein* (LDL) teroksidasi secara berlebihan dan terakumulasi. Terdapat tiga komponen utama pembentuk lesi aterosklerosis, yaitu 1) komponen selular sel otot polos dan makrofag, 2) jaringan matrik dan lipid ekstraselular, dan 3) lipid intraselular yang terakumulasi di dalam makrofag. Perkembangan aterosklerosis dapat menstimuli peradangan yang dapat melepaskan berbagai sitokin, memproliferasi sel otot polos, mensintesis matrik jaringan konektivus, dan mengterakumulasi makrofag dan lipid (Crowther, 2005). Berbagai faktor risiko penyebab aterosklerosis seperti hiperlipidimia, hipertensi, diabetes melitus, obesitas, dan angka hidup yang meningkat dapat menimbulkan penyakit jantung

<sup>1)</sup> Lab. Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

<sup>2)</sup> Staf pengajar pada Fakultas Kedokteran Hewan, IPB

<sup>3)</sup> Staf pengajar pada Departemen Biokimia, FMIPA IPB

koroner (PJK). Berdasarkan hasil survei kesehatan rumah tangga di Indonesia pada 27 provinsi, angka kejadian PJK terus meningkat dari 9,9% (1992) menjadi 19% pada tahun 1995. Data terakhir pada tahun 2001, mencapai 26,4%. Kondisi ini menduduki peringkat pertama penyebab kematian, mengungguli angka kematian yang disebabkan oleh penyakit infeksi. Analisis epidemiologis menunjukkan bahwa perubahan gaya hidup termasuk pola makan sehari-hari memiliki hubungan yang nyata dengan meningkatnya kejadian penyakit kardiovaskuler (Wuryastuti, 2000; Priyana, 2004).

Usaha mengatasi peningkatan penyakit kardiovaskuler juga diharapkan disertai dengan meningkatnya kemajuan di bidang teknologi pengobatan. Berbagai macam obat jadi telah dihasilkan untuk mengobati berbagai macam penyakit sehingga banyak jenis dan macam penyakit dapat disembuhkan. Krisis ekonomi yang berkepanjangan menyebabkan banyak sekali masyarakat Indonesia yang mengabaikan masalah kesehatan. Untuk menyikapi masalah tersebut, banyak dikembangkan produk obat alami yang bersumber dari tanaman asal Indonesia. Khasiat dan penggunaan tanaman sebagai bahan obat biasanya diketahui secara turun-menurun dari nenek moyang.

Saat ini secara ekonomis masyarakat sangat mengharapkan dapat memperoleh obat alami yang murah dan tersedia melimpah. Temu mangga (*Curcuma mangga*) merupakan tanaman obat yang belum banyak dimanfaatkan dan diteliti. Temu mangga termasuk dalam jenis temu-temuan yang mengandung senyawa kurkuminoid dan flavonoid yang dipercaya berfungsi sebagai antioksidan (Serejevan *et al.*, 1997). Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sel terhadap efek kerusakan yang disebabkan radikal bebas dan reaksi spesies oksigen yang menghasilkan singlet oksigen, superoksid, radikal peroksil, atom radikal, dan peroksi nitrit. Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil yang dapat merusak DNA dan mitokondria sehingga akan merusak fungsi kesehatan membran dan organ. Kerusakan ini akan mengganggu replikasi normal material selular sel seluruh tubuh (Haliwell, 2005; Rao, 1995).

Quiles *et al.* (2002) melaporkan bahwa ekstrak kurkuminoid *Curcuma longa* secara *in vitro* pada konsentrasi 4-9.6 mg/L mampu menghambat peroksidasi lipid dari makrofag manusia. Hasil uji *in vivo* pada manusia dewasa yang diberi ekstrak kurkuminoid dari temu-temuan yang sama dengan dosis 500 mg per hari selama 7 hari berturut-turut dapat menurunkan peroksidasi lipid sebesar 35% (Serejevan *et al.* 1997). Proses oksidasi lipid pada makrofag diharapkan dapat dihambat dengan pemberian kurkuminoid yang terkandung dalam fraksi ekstrak temu mangga. Makrofag adalah sel hasil diferensiasi monosit. Sel ini mempunyai dua reseptor khusus untuk menangkap kolesterol, yaitu *low density lipoprotein* (LDL) *receptor* dan *scavenger receptor* yang mengikat LDL teroksidasi. LDL teroksidasi tidak akan dikenali oleh reseptor LDL sehingga akan menjadi salah satu ligan reseptor. Beberapa data menyatakan bahwa kurkuminoid (kurkumin) dapat berfungsi sebagai antioksidan yang akan melindungi LDL dari oksidasi sehingga pengambilan lipoprotein oleh sel makrofag dapat dikurangi, akibatnya pembentukan sel busa dapat dicegah. Penelitian ini bertujuan menentukan mekanisme kurkuminoid ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga*) dalam menghambat perkembangan aterosklerosis di tingkat selular dan mendapatkan dosis efektif ekstrak temu mangga dalam menghambat proses awal patogenesis aterosklerosis secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di beberapa fasilitas, yaitu Laboratorium Terpadu IPB, Pusat Studi Biofarmaka dan Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat IPB, Laboratorium Hewan, Patologi dan Lipid, serta Laboratorium Mikrobiologi Imunologi. Waktu pelaksanaan dimulai pada tahun 2004 sampai dengan 2007.

### Alat dan Bahan

Lima ekor monyet ekor panjang (MEP, *Macaca fascicularis*) jantan untuk pemanenan LDL, 20 ekor mencit, dan 3 ekor beruk (*Macaca nemestrina*) jantan untuk isolasi makrofag digunakan dalam penelitian ini. Seluruh perlakuan pada hewan telah disetujui oleh Komisi Kesejahteraan Penggunaan Hewan Laboratorium di PSSP IPB. Temu mangga sebanyak 3 kg diperoleh dari Pasar Anyar Bogor. Bahan kimia, antara lain, *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Gibco, Cat. no. 12100-046), *Rosswell park memorial institute* (RPMI-1640, Sigma), *pheripheral blood mononuclear cells* (PBMC, Ficoll-Paque Plus Amersham, Biociences), *phosphate buffer saline* (PBS), *fetal bovine serum* (FBS, Sigma), asam tiobarbiturat (Sigma), *bovine serum albumine* (BSA, Sigma), dan etanol absolut (Merck) juga digunakan.

### Prosedur Pengumpulan Data

#### Isolasi LDL

LDL plasma diisolasi dari lima ekor MEP. Pada tahap awal, MEP diadaptasikan selama 2 minggu dan kemudian diberi pakan aterogenik selama 3 bulan (Adam *et al.*, 1985). Monyet dipuaskan selama 24 jam sebelum pengambilan plasma darah pada vena femoralis dan disedasi menggunakan ketamin 10-15 mg/kg bobot badan.

Isolasi LDL dalam penelitian ini menggunakan metode yang dilakukan oleh Sulistiyani *et al.* (1991). Plasma darah dipisahkan melalui sentrifugasi selama 30 menit dengan menggunakan Beckman GS-6R *low speed centrifuge* dengan kecepatan 1.800 g pada suhu 4°C. Selanjutnya, sebanyak 8 ml plasma darah dimasukkan ke dalam tabung polialimer dan ditambahkan 5 ml larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA (b/v) secara hati-hati hingga tabung penuh. Larutan NaCl-EDTA ini berfungsi sebagai gradien densitas. Plasma darah disentrifus menggunakan ultrasentrifugasi Beckman XL-90 dengan rotor SW 40 pada suhu 4°C selama 20 jam dengan kecepatan 23.000 g. Dari pemusingan diperoleh  $\beta$ -VLDL yang terpisah, dengan cara mengambil lapisan bagian bawah ( $d > 1,006$  g/ml) adalah LDL dan lapisan atas ( $d < 1,006$  g/ml). Lapisan bawah ini ditambahkan KBr sebanyak 0,1109 g/ml kemudian dicampur hingga larut dan merata. Campuran larutan tersebut diambil 9 ml dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus polialimer yang baru dan ditambahkan 4 ml KBr ( $d = 1,063$  g/ml) yang mengandung larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA, lalu disentrifus dengan menggunakan ultrasentrifugasi dengan rotor SW-40 pada kecepatan 23000g pada suhu 4°C selama 24 jam, dari pemusingan akan diperoleh LDL pada lapisan atas dan dipisahkan dengan

menggunakan alat pemotong tabung. Fraksi LDL selanjutnya dilakukan proses dialisis dengan larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA, pH 7,4/4°C dilakukan 3 x 2 L selama 72 jam. LDL yang diperoleh disaring dengan *millipore* 0,45 µm. Fraksi yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C kemudian dilakukan pengujian terhadap kandungan protein dengan uji *Lowry* dan *bovine serum albumin* (BSA) digunakan sebagai standar.

### **Oksidasi LDL**

Sediaan LDL yang telah diukur proteinnya di-dialisis kembali menggunakan larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA, pH 7,4/4°C dilakukan 3x2 L selama 72 jam (Kleinveld *et al.*, 1992). Oksidasi LDL dilakukan dengan menginkubasikan LDL dengan CuSO<sub>4</sub> 5 µmol dalam inkubator 37°C selama 4 jam. Derajat oksidasi LDL yang terbentuk diukur dengan uji asam tiobarbiturat yang umumnya adalah malonaldehida (Conti *et al.*, 1991; Rafisi dan Avadis, 1992).

### **Isolasi ekstrak kurkuminoid temu mangga**

Rimpang temu mangga sebanyak 3 kg pada mulanya dicuci dan diiris tipis, lalu dikeringkan dan dibuat serbuk. Serbuk tersebut dimaserasi dengan air hangat 80°C, disaring sehingga diperoleh ekstrak air dan residu. Ekstrak air diuapkan dengan menggunakan vakum evaporator selama 2 jam pada suhu 60°C. Sisa residu diekstrak kembali dengan etanol absolut dan dipanaskan selama 2 jam pada suhu 60°C. Hasil ekstrak disaring kemudian diuapkan menggunakan vakum evaporator sehingga diperoleh ekstrak alkohol. Kedua ekstrak (air dan alkohol) dicampur dengan perbandingan 1:1 dan suspensikan kembali sehingga diperoleh ekstrak hidroalkohol (Quiles *et al.*, 2002). Fraksi kurkuminoid diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan *Beckman Diode Array Detector* (model 168), kolom LC-18 *supelcosil* (150 mmx4.6 mm dan 5 µm *supelco*), dan fase gerak metanol:asam asetat:asetonitril dengan panjang gelombang (λ) 425 nm, suhu kolom 30°C, dan laju alir adalah 1 ml/menit.

### **Isolasi makrofag mencit**

Mencit diinjeksi secara peritoneal dengan 2.5 ml tioglikolat (24 g/L dalam larutan salin). Sel dipanen setelah 4 hari kemudian, lalu dicuci dan disentrifus 3 kali dengan PBS pada 1500 g selama 10 menit pada suhu 25°C. Sel kemudian suspensikan kembali dan dikonsentrasikan 1x10<sup>6</sup>/ml dengan DMEM yang mengandung 10% FBS, 10.000 IU penisilin/L, 100 mg streptomisin, dan 2 mmol glutamin/l. Suspensi sel ditumbuhkan dalam *microplate* (8 sumur) 35 mm dan diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO<sub>2</sub> dan 95% udara selama 4 jam. Sel dicuci dengan 5 ml DMEM untuk membuang sel yang tidak menempel, sedangkan sel *monolayer* diinkubasi kembali selama 18-24 jam sampai makrofag siap digunakan (Aviram *et al.*, 2000).

### **Isolasi makrofag monosit *Macaca nemestrina***

Darah diambil dari vena femoralis monyet yang telah dibius dengan ketamin 10-15 mg/kg bb. Darah-EDTA yang diperoleh disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1.500 g pada suhu 4°C, *buffy coat* dipisahkan dan ditampung dalam tabung yang telah berisi PBS dan dicampur (1:1). Campuran tersebut kemudian ditambah dengan *lymphosite separation medium* (LSM) yang mengandung 6,2 g ficoll dan 9,49 g sodium diatrizole) lalu disentrifus kembali selama 30 menit dengan

kecepatan 1.500 g pada suhu 4°C. *Pheripheral blood mononuclear cells* (PBMC) dipanen dan dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi PBS. Selanjutnya, disentrifus pada 2.500 g selama 15 menit pada 4°C (3 kali). Pelet dipisahkan dan dimasukkan ke tabung yang telah berisi RPMI (Gibco, Invitrogen Corp), lalu diresuspensi untuk dihitung dengan menggunakan 2% CH<sub>3</sub>COOH. Setelah dihitung, sel dikultur dalam *microplate* yang berisi RPMI mengandung 10% PBS (Gibco, Invitrogen Corp), 100.000 U penisilin/L, 100 mg streptomisin dan 2 mmol glutamin/L. Suspensi sel ditumbuhkan pada 35 mm *microplate* dan diinkubasi dalam inkubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% udara) 37°C selama 4 jam. Sel dicuci dengan 5 ml RPMI untuk membuang sel yang tidak menempel pada dasar *microplate* sedangkan sel *monolayer* diinkubasi kembali dengan RPMI selama 18-24 jam sampai makrofag konfluen kemudian medium diganti dan makrofag siap digunakan.

### **Pengaruh ekstrak kurkuminoid *Temu mangga* terhadap oksidasi LDL**

Makrofag (mencit dan beruk) sebanyak dua juta sel per ml ditambah dengan ekstrak temu mangga dan diinkubasi selama 24 jam dengan konsentrasi 2 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm/ml dalam medium yang mengandung 10% FBS (v/v) pada suhu 37°C. Kontrol dibuat tanpa menambahkan ekstrak temu mangga dan hanya diinkubasi dengan 0,05% etanol. Setelah itu sel dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali kemudian ditamba dengan LDL teroksidasi sebanyak 200 µg/ml dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan waktu inkubasi 4 jam dan 6 jam. Derajat oksidasi LDL dengan uji asam tiobarbiturat (TBARS, thiobarbiturate acid reactive substance) yang menghasilkan malonaldehid (MDA).

### **Analisis Data**

Data hasil rata-rata oksidasi LDL, yaitu MDA dianalisis dengan peubah ANOVA satu arah (*one way Anova*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji Tukey.

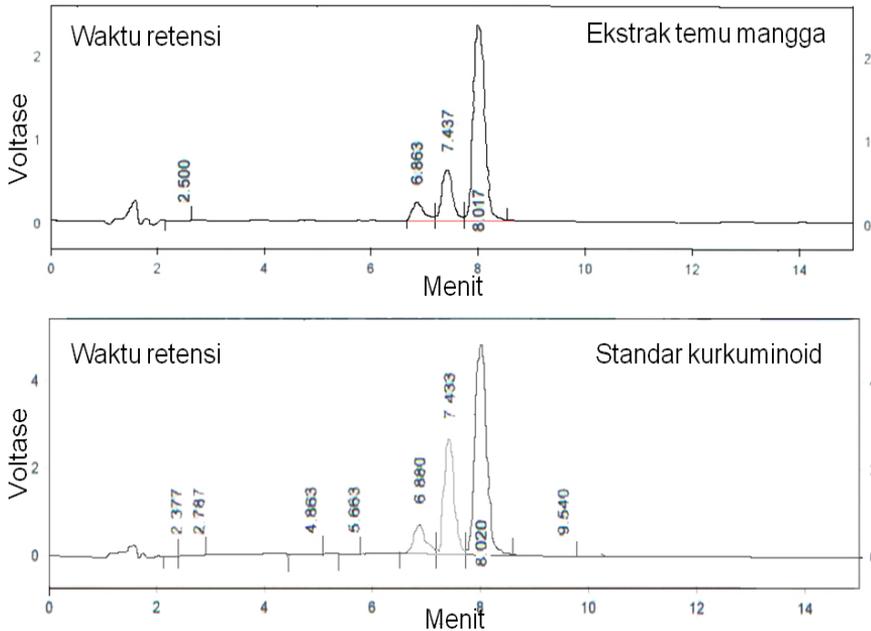
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Kurkuminoid**

Ekstrak kurkuminoid temu mangga yang menggunakan metode maserasi dan etanol absolut berwarna kuning kecoklatan dan diperoleh sebanyak 0,552% bobot kering. Hasil penelitian dengan *Curcuma longa L.* oleh Quiles *et al.* (2002) dan Tonnesen (1992) dengan berbagai pelarut ekstraksi, yaitu etanol, aseton butanol, benzene, dan petroleum eter, diperoleh 1-5% dari bobot kering. Hasil ekstraksi dengan jumlah yang sedikit kemungkinan karena jenis pelarut yang digunakan hanya air dan etanol. Pengujian selanjutnya untuk fraksi kurkuminoid menggunakan KCKT yang dibandingkan dengan standar kurkumin (SIGMA).

Gambar 1 memperlihatkan bahwa kurkuminoid yang diisolasi dari temu mangga terdiri atas beberapa fraksi. Hal ini dapat dilihat dari terbentuknya empat waktu retensi dengan luas area dan ketinggian yang berbeda. Waktu retensi dan luas area tersebut terdiri atas kurkumin (8,017, 71,92%, dan 72,59%), demetoksi kurkumin (7,437, 18,88%, dan 19,54%), serta bisdemetoksi kurkumin (6,833,

8,11%, dan 7,18%). Hasil fraksi dari temu mangga dibandingkan dengan standar kurkumin yang mempunyai 8 waktu retensi dengan luas area menunjukkan bahwa masing-masing fraksi mempunyai konsentrasi kurkuminoid yang berbeda, baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Menurut Quiles *et al.* (2002), kurkuminoid hasil KCKT terdiri atas 3 fraksi, yaitu kurkumin (7,34%), demetoksi kurkumin (1,97%), dan bisdemetoksi kurkumin (0,7%).



Gambar 1. Hasil fraksinasi kurkuminoid temu mangga dan standar kurkumin

Dilihat dari strukturnya, kurkuminoid mengandung grup fenolik yang sangat esensial untuk skavenger superoksid dan keberadaan grup orto akan meningkatkan aktivitas fenolik. Kurkumin mampu mengeliminasi radikal bebas dari turunan oksigen yang memberikan respons peroksidasi lipid, radikal hidroksi, superoksid, singlet oksigen, nitrogen dioksid, dan  $\text{NO}_2$  (Sreejevan *et al.*, 1994, Reddy *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1995; Unnikrishnan dan Rao, 1997, Sreejevan dan Rao, 1997). Bahkan telah didemonstrasikan bahwa kurkumin mampu menghambat turunan dari radikal superoksid (Rubby dan Lokesh, 1995).

### Oksidasi *low density lipoprotein* (LDL)

Konsentrasi MDA pada saat oksidasi LDL dilakukan penambahan makrofag yang diukur dengan metode uji TBA dengan atau tanpa kurkuminoid. Ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  mempercepat terjadinya proses reaksi oksidasi LDL makrofag yang akan menghasilkan hidroperoksida lipid, sedangkan hidroperoksida lipid bukanlah produk akhir yang stabil dan akan segera diubah menjadi berbagai produk akhir seperti aldehid, keton, alkohol, epoksi, dan hidrokarbon. Malonaldehid (MDA) merupakan salah satu produk akhir reaksi oksidasi LDL yang akan bereaksi dengan asam tiobarbiturat membentuk TBARS yang merupakan kompleks MDA-

TBA dengan memberikan warna merah dan mempunyai serapan spesifik pada panjang gelombang 532 nm (Tabel 1 dan 2, dan Gambar 2 dan 3).

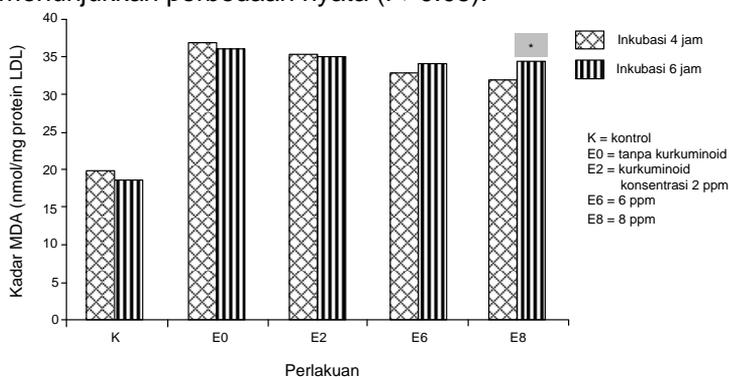
Kurkuminoid ekstrak temu mangga 8 ppm yang diberi LDL dalam medium pertumbuhan mampu menurunkan konsentrasi MDA sebesar 36% pada inkubasi 4 jam dan 47% pada 6 jam ( $P < 0,05$ ) (inkubasi 4 jam: konsentrasi MDA  $33,15 \pm 0,14$  vs  $24,18 \pm 0,17$  dan pada 6 jam  $38,29 \pm 0,28$  vs  $30,18 \pm 0,31$  nmol/mg protein LDL). Besarnya konsentrasi MDA yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh lamanya masa inkubasi yang dihasilkan pada proses oksidasi yang berbeda.

Tabel 1. Rata-rata konsentrasi MDA (nmol/mg protein) pengaruh ekstrak *Temu mangga* pada reaksi oksidasi LDL terhadap sel makrofag mencit (inkubasi 4 jam dan 6 jam)

Perlakuan	N	Konsentrasi MDA (nmol/mg protein LDL)	
		Inkubasi 4 jam	Inkubasi 6 jam
Sel + LDL	3	19,948 ± 0,004	18,980 ± 0,043
Sel + LDL + Cu <sup>2+</sup> + E <sub>0</sub>	3	36,770 <sup>A</sup> ± 0,904	36,054 ± 2,022
Sel + LDL + Cu <sup>2+</sup> + E <sub>2</sub>	3	35,398 <sup>A</sup> ± 1,059	35,150 ± 1,221
Sel + LDL + Cu <sup>2+</sup> + E <sub>6</sub>	3	32,893 <sup>BA</sup> ± 0,176	34,190 ± 1,697
Sel + LDL + Cu <sup>2+</sup> + E <sub>8</sub>	3	31,965 <sup>B</sup> ± 0,029	34,544 ± 0,715

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ), E<sub>0</sub>: tanpa kurkuminoid; E<sub>2</sub>: kurkuminoid konsentrasi 2 ppm; E<sub>6</sub>: 6 ppm, E<sub>8</sub>: 8 ppm

Pada Tabel 1, sel makrofag mencit yang diberi ekstrak kurkuminoid temu mangga pada 8 ppm (inkubasi 4 jam) dapat menurunkan proses LDL yang dioksidasi dengan ion logam Cu<sup>2+</sup> sangat bermakna. Proses oksidasi LDL dapat dihambat sebesar 17% ( $P < 0.01$ ) yang ditandai adanya penurunan konsentrasi MDA. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa di antara perlakuan E<sub>0</sub> terhadap E<sub>6</sub> dan E<sub>8</sub> sangat bermakna, sedangkan E<sub>0</sub> terhadap E<sub>2</sub> dan E<sub>6</sub> terhadap E<sub>8</sub> tidak bermakna, kondisi ini menandakan bahwa konsentrasi 6ppm (E<sub>6</sub>) sudah cukup menekan peningkatan konsentrasi MDA selama proses oksidasi. Hasil inkubasi 6 jam, tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $P > 0.05$ ).



Gambar 2. Konsentrasi MDA (nmol/mg protein LDL) pada makrofag mencit yang diberi ekstrak kurkuminoid temu mangga dengan konsentrasi 2 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm yang diinkubasi selama 4 jam dan 6 jam

Pada Gambar 2 dan 3, sel makrofag mencit dan beruk (*Macaca nemestrina*) yang ditambah LDL tanpa Cu<sup>2+</sup> dapat mengalami proses oksidasi setelah

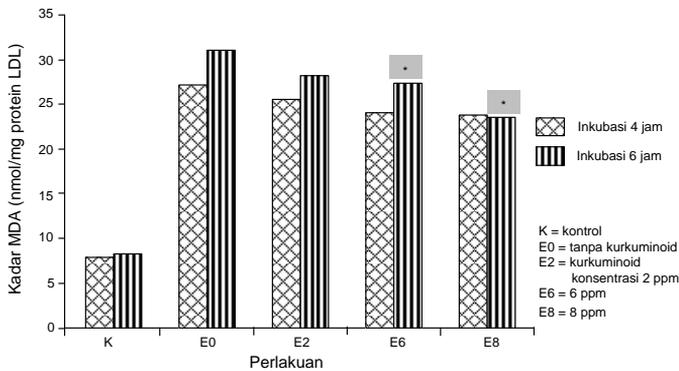
diinkubasi selama 4 jam dan 6 jam. Namun demikian, konsentrasi MDA yang dihasilkan jauh lebih rendah daripada LDL yang ditambahkan  $\text{Cu}^{2+}$  tanpa ekstrak kurkuminoid. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ion  $\text{Cu}^{2+}$  benar mempercepat proses reaksi oksidasi LDL.

Tabel 2. Rata-rata konsentrasi MDA (nmol/mg protein) pengaruh ekstrak kurkuminoid temu mangga reaksi proses oksidasi LDL yang diinduksi  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap sel makrofag darah *Macaca nemestrina* selama inkubasi 4 jam dan 6 jam

Perlakuan	N	Konsentrasi MDA (nmol/mg protein LDL)	
		Inkubasi 4 jam	Inkubasi 6 jam
Sel + LDL	3	7,889±0,015	8,240±0,855
Sel + LDL + $\text{Cu}^{2+}$ + E <sub>0</sub>	3	27,111 <sup>A</sup> ±0,972	30,862 <sup>A</sup> ±2,494
Sel + LDL + $\text{Cu}^{2+}$ + E <sub>2</sub>	3	25,447 <sup>AB</sup> ±0,050	28,105 <sup>AB</sup> ±1,234
Sel + LDL + $\text{Cu}^{2+}$ + E <sub>6</sub>	3	24,023 <sup>B</sup> ±0,114	27,211 <sup>AB</sup> ±1,917
Sel + LDL + $\text{Cu}^{2+}$ + E <sub>8</sub>	3	23,768 <sup>B</sup> ±0,095	23,368 <sup>B</sup> ±0,119

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ), E<sub>0</sub>: tanpa kurkuminoid; E<sub>2</sub> kurkuminoid konsentrasi 2 ppm; E<sub>6</sub>: 6 ppm, E<sub>8</sub>: 8 ppm

Pada Tabel 2, ekstrak kurkuminoid temu mangga 8 ppm pada sel makrofag *Macaca nemestrina* dapat menurunkan proses oksidasi LDL yang diinduksi dengan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  sangat bermakna ( $P < 0,01$ ). Penurunan oksidasi ini terjadi sebesar 23% dan 14% yang ditandai dengan menurunannya konsentrasi MDA (inkubasi 4 dan 6 jam). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kurkuminoid yang diberikan, semakin nyata penurunan proses oksidasi LDL yang terjadi. Hasil uji Tukey antara perlakuan E<sub>0</sub> dengan E<sub>6</sub> dan E<sub>0</sub> dengan E<sub>8</sub> menunjukkan adanya penurunan konsentrasi MDA yang sangat bermakna ( $P < 0,01$ ), baik pada inkubasi 4 jam maupun 6 jam.



Gambar 3. Konsentrasi MDA (nmol/mg protein LDL) pada makrofag *M. nemestrina* yang diberi ekstrak kurkuminoid temu mangga dengan konsentrasi 2 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm yang diinkubasi selama 4 jam dan 6 jam

Penurunan reaksi oksidasi-LDL ini disebabkan oleh kandungan yang terdapat di dalam ekstrak temu mangga cukup kuat sebagai antioksidan dan inhibitor terhadap ion logam yang berperan dalam menginduksi peroksidasi lipid (Tabel 1 dan 2). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan dalam penelitian ini, semakin nyata oksidasi LDL dapat ditekan.

Uji asam tiobarbiturat terhadap jumlah LDL teroksidasi dapat mengindikasikan terjadi peningkatan lipid peroksidasi pada semua sistem yang mengandung hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Hidrogen peroksida mempunyai kekuatan efek, tetapi efek ini dapat dicegah oleh antioksidan dalam penelitian dan sebaliknya. Senyawa logam memegang peranan penting dalam menghasilkan oksidan yang dapat menginisiasi peroksidasi. Katalisasi-logam yang dihasilkan oleh radikal bebas merupakan faktor penting dalam progresi suatu penyakit (Halliwell dan Gutteridge, 1995). Secara *in vitro*, ada tiga fase proses oksidasi LDL dengan ion logam ( $Cu^{2+}$ ), yaitu inisiasi fase lag (mengonsumsi antioksidan endogen), fase propagasi (dengan cepat terjadi oksidasi dari asam lemak tidak jenuh menjadi lipid hidroksiperokasid) dan fase dekomposisi (hidroksiperokasid diubah menjadi aldehid yang reaktif seperti malodialdehid, 4-hidroksinonenal). LDL yang teroksidasi ion logam ( $Cu^{2+}$ ) dapat dihambat oleh kurkumin, tetapi aktivitas bisdemostoksi kurkumin menurun (Sreejevan dan Rao, 1997).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Ekstra kurkuminoid temu mangga (*Curcuma mangga*) dapat menghambat reaksi oksidasi LDL di tingkat selular pada sel makrofag mencit dan beruk (*Macaca nemestrina*) sehingga dapat mencegah meningkatnya konsentrasi MDA secara *in vitro* yang diinkubasikan dengan LDL teroksidasi ion logam  $Cu^{2+}$ . Proses oksidasi LDL dapat dihambat dengan ekstrak kurkuminoid 8 ppm sebesar 17% ( $P < 0.01$ ) pada makrofag mencit, sedangkan pada makrofag nemestrina sebesar 14.8 % dan 23% ( $P < 0.01$ ).

### Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikan adanya penghambatan oksidasi LDL oleh temu mangga secara *in vivo* pada hewan laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aviram M. *et al.* 2000. Promegenate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL and aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J Nutr.* 71:1062
- Conti M, Moraud PC, Levillain P, Emonier. 1991. Improved flouroelettric determination of malonaldehyde. *Clin.Chem.* 37: 1273-1275
- Crowther MA. 2005. Pathogenesis of atherosclerosis. *The American Society of Hematology.*
- Halliwell B. 2005. Free Radicals and Other Reactive Spesies in Desease. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now. *J. Lab Clin Med.* 119(6): 598-620.

- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. 1992. Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: Application of a short procedure of isolation low-density lipoprotein. *Clin. Chem.* 38: 2066-2072.
- Priyana A. 2004. Anggur merah baik untuk jantung. *Kompas*, 13 April hal. 36.
- Quiles JL *et al.* 2002. *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1225-1231.
- Rafisi VA. and Khacharudian. 1992. The Inhibition of low density lipoprotein oxidation by 17 $\beta$ -Estradiol. *Metabolism.* 41(10):1110-1114.
- Rao MNA. 1995. Antioxidant properties of curcumin. Di dalam Curcumin Pharmacology. Proceeding of the International Symposium on Curcumin Pharmacology (ISCP) August 29-31, 1995, Yogyakarta Indonesia.
- Reddy AC, Lokesh BR. 1994. Studies on the inhibitory effects of curcumin and ferrous iron. *Mol Cell Biochem.* 137: 1-8.
- Rubby LBR. 1995. Anti-tumor and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* 146: 35-37.
- Sreejayan N, Rao MNA. 1997. Curcuminoid as potent inhibitor of lipid peroxidation. *J. Phar. Pharmacols:* 46: 1013-1016.
- Stocker R, Keanedy JF Jr. 2004. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84:1381-1478.
- Sulistiyani St, Clair RW. (1991). The method of isolation of primary cells and their subculture influence the expression of LDL receptor on pigeon and chicken embryo cells in culture. *Arterioscler.* 91: 123-135.
- Unnikrishnan MK, Rao MNA. 1995. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Mol Cell Biochem.* 146: 35-37.
- Tonnesen NH, Vries HD, Karlse J, Henengouwen GB. 1987. Studies of curcumin and curcuminoid IX investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indication system. *J. Pharm. Sci.* 76: 371-373.
- Tonnesen NH, Smistad G, Agren T, Karlse J. 1992. Studies of curcumin and curcuminoid. XX III: Effects of curcumin on liposomal lipid peroxidation.
- Wuryastuti H. 2000. Stres oksidatif dan implikasinya terhadap kesehatan. Pidato Guru Besar dalam Ilmu Penyakit Dalam pada FKH-UGM, Yogyakarta.