

683 Sp.



LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2002

POTENSI DAN MEKANISME KERJA CURCUMINE YANG DIISOLASI DARI ENDOTHELIUM PADA HYPERKOLESTEOLEMIA

Oleh:

Drh. SRI AGUS SUDJARWO, Ph.D.
Dr. SITI PURNAWATI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
DIP Nomor : 019/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 11

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002



LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2002

POTENSI DAN MEKANISME KERJA CURCUMINE YANG DIISOLASI DARI ENDOTHELIUM PADA HYPERKOLESTEOLEMIA

Oleh:

Drh. SRI AGUS SUDJARWO, Ph.D.
Dr. SITI PURNAWATI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
DIP Nomor : 019/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 11

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

September, 2002

**LEMBAGA PENELITIAN**

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1.a. Judul Penelitian	: Potensi Dan Mekanisme Kerja Curcumine yang Di Isolasi Dari Temulawak (Curcuma xanthorica Roxb) Untuk Proteksi Sel Endothelium Pada Hiperkholesterolemia
b. Macam penelitian	: (v) Fundamental, () Terapan, () Pengembangan, () Institusional
c. Kategori Penelitian	: (v) I () II () III () IV
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap dan gelar	: drh. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D
b. Jenis Kelamin	: Laki-Laki
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata (Gol IIIc) 131 406 098
d. Jabatan Sekarang	: Staf Pengajar
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Kedokteran Hewan/Farmakologi
f. Univ/Inst/Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang Diteliti	: Farmakologi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 1 (satu) orang
4. Lokasi Penelitian	: Universitas Airlangga
5. Kerjasama dengan Instansi Lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka Waktu Penelitian	: 10 bulan
7. Biaya Yang Diperlukan	: 10.000.000
8. Seminar Hasil Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	: 6 Oktober 2002
b. Hasil Penelitian	: () Baik Sekali (v) Baik () Sedang () Kurang

Surabaya, 24 Oktober 20002

Mengetahui
Dekan
Fakultas Kedokteran Hewan

DR. Ismudiono, MS., Drh
NIP 130 687 297

Mengetahui/Mengesahkan
a.n Rektor
Ketua Lembaga Penelitian

Prof.Dr. H. Sarmanu, MS
NIP 130 701 125

ABSTRACT :

**POTENCY AND MECHANISM OF ACTION OF CURCUMINE
FOR PROTECTIVE EFFECT ON ENDOTHELIAL CELL
IN HYPERCHOLESTEROLEMIA**

Sri Agus Sudjarwo

Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine

Airlangga University, Surabaya

Protective effect of curcumine on endothelial cell were studied in cholesterol-fed rabbits. The cholesterol-rich diet markedly increased Malondialdehyde (MDA) in the plasma, as reflected by Thiobarbitonic Acid-Reactive Substances (TBARS) and decreased endothelium-dependent vascular relaxations to acetylcholine compared to vessels from normal rabbits. In cholesterol-fed rabbits, curcumine treatment decreased MDA in plasma production and increased endothelium-dependent relaxations to acetylcholine.

These results suggest that dietary treatment of rabbits with curcumine may prevent superoxide anion (O_2^-) induced inactivation of endothelium-dependent relaxing factor (EDRF), improve the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the aortic blood vessels and increase cyclic GMP content in aortic cholesterol-fed rabbits.

RINGKASAN :

**POTENSI DAN MEKANISME KERJA CURCUMINE YANG DIISOLASI DARI
TEMU LAWAK (CURCUMA XANTHORICA ROXB) UNTUK PROTEKSI
SEL ENDOTHELIUM PADA HYPERKHOLESTEROLEMIA.**

**Sri Agus Sudjarwo, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga, Surabaya**

Telah dilakukan suatu penelitian yang bertujuan untuk membuktikan bahwa curcumine yang diisolasi dari temu lawak (*Curcuma xanthorica roxb*) dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan penglepasan EDRF pada kelinci hyperkholesterolemia.

24 ekor kelinci secara acak dibagi menjadi 4 kelompok sebagai berikut : 6 ekor kelinci diberi makanan tanpa kolesterol (kontrol negatif), 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 % (kontrol positif), 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumin dengan dosis 20 mg/kg BB (perlakuan I) dan 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumin dengan dosis 40 mg/kg BB (perlakuan II). Setelah 8 minggu dari perlakuan, pada semua hewan percobaan diambil darahnya untuk diperiksa kadar MDA (Malondialdehyde) dan selanjutnya semua hewan percobaan dibunuh dan diambil pembuluh darahnya yaitu pada aorta untuk diperiksa besarnya EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) yang dilepaskan oleh sel endothelium dan juga dilakukan pemeriksaan kadar c GMP.

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data dan hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Analisa Varian yang dilanjutkan dengan Uji LSD.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian curcumin dosis 20 mg/KgBB dan 40 mg/Kg BB dapat menurunkan kadar MDA dalam plasma dan meningkatkan penglepasan EDRF serta dapat meningkatkan kadar c GMP pada kelinci hyperkholesterolemia.

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan untuk menggali lebih dalam potensi curcumine untuk proteksi sel endothelium pada penyakit lain seperti pada diabetes melitus, hipertensi dan mengukur kadar Nitrik Oksid, c GMP dan sirkulasi sel endothelium.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat-Nya, sehingga penelitian tentang potensi dan mekanisme kerja dari curcumine yang diisolasi dari temu lawak (*Curcuma xanthonica roxb*) untuk proteksi sel endothelium pada hyperkholesterolemia dapat terselesaikan.

Gangguan kardiovaskuler merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia. Dengan semakin mahalnya harga obat dan semakin meningkatnya gangguan kardiovaskuler ini maka pemerintah telah menggalakan penelitian untuk mencari obat baru sebagai obat alternatif terutama yang berasal dari tanaman untuk menunjang obat yang sudah ada. Oleh karena itu penulis tertarik untuk meneliti curcumine yang merupakan bahan aktif dari tanaman temu lawak yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti di Indonesia untuk gangguan kardiovaskuler yaitu untuk proteksi sel endothelium pada hyperkholesterolemia. Dari penelitian ini diharapkan dapat ditemukan obat baru yang murah, poten dan mudah didapatkan sehingga hasilnya dapat berguna bagi masyarakat banyak.

Hasil penelitian ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada Rektor UNAIR, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR dan Ketua Lembaga Penelitian UNAIR serta kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini sehingga dapat terselesaikan..

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada masyarakat banyak,

Surabaya, September 2002

Sri Agus Sudjarwo

DAFTAR ISI

	Halaman
IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
ABSTRACT	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB. I PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang Masalah	1
I.2. Perumusan Masalah	3
I.3. Hipotesis	3
BAB. II. TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Tinjauan Tentang Curcumine	4
II.1.1 Struktur dan Sifat Kimia Curcumine	4
II.1.2 Efek Biologik Curcumine	5
II.2. Tinjauan Tentang Endothelium	5
II.2.1 <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>	6
II.2.2 Peran Endothelium Pada Gangguan Kardiovaskuler	7
II.2.3 Disfungsi sel Endothelium	8
II.3. Tinjauan Tentang Radikal Bebas	10
II.3.1 Efek Radikal Bebas Terhadap Asam Lemak Tak Jenuh	11
II.3.2 Efek Radikal Bebas Terhadap DNA	11
II.3.3 Efek Radikal Bebas Terhadap Protein	11
II.4. Malondialdehyde (MDA)	11
II.5. Siklik GMP (c GMP)	12
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT	14
BAB IV. METODE PENELITIAN	15
IV.1. Tempat dan Waktu Penelitian	15
IV.2. Materi Penelitian	15

	Halaman
IV.3. Prosedure Penelitian	15
IV.4. Rancangan Penelitian Dan Analisa Data	18
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
V.1. Pengaruh Curcumine Terhadap Kadar MDA	19
V.2. Pengaruh Curcumine Terhadap EDRF	21
V.1. Pengaruh Curcumine Terhadap Kadar c GMP	25
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

TABEL :

	Halaman
1. Rata-rata dan simpangan baku kadar MDA dari berbagai kelompok	19
2. Rata-rata dan simpangan baku relaksasi aorta dari asetilkolin pada berbagai kelompok	22
3. Rata-rata dan simpangan baku kadar c GMP dari berbagai kelompok	25

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR:

	Halaman
1. Struktur Kimia Curcumine	4
2. Proses Transduksi Signal Endothelium	6
3. Disfungsi Sel Endothelium	10
4. Mekanisme Relaksasi Otot Polos Pembuluh Darah dari Asetikholin, Endothelin, Bradikinin dan Histamin	12
5. Kadar MDA Plasma Kelinci dari berbagai kelompok	20
6. Relaksasi Aorta dari Asetikholin pada berbagai kelompok	23
7. Kadar siklik GMP Kelinci dari berbagai kelompok	26

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN :

	halaman
1. Data Kadar MDA Dari Berbagai Kelompok	34
2. Analisis Statistik Kadar MDA Dari Berbagai Kelompok	35
3. Data Relaksasi Asetilkholin Dari Berbagai Kelompok	36
4. Analisis Statistik Relaksasi Asetilkholin Dari Berbagai Kelompok	37
5. Data Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok	40
6. Analisis Statistik Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok	41

BAB I PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang Masalah

Di Indonesia, penyakit kardiovaskuler (jantung koroner dan pembuluh darah) merupakan salah satu penyebab kematian yang terbesar. Telah dilaporkan bahwa ada beberapa faktor resiko terhadap gangguan kardiovaskuler ini antara lain hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes, kurang olah raga, kegemukan dan umur (Steinberg and Witztum, 1990).

Dari beberapa faktor di atas, hiperkolesterolemia ternyata paling berperan terhadap gangguan kardiovaskuler, terutama untuk terjadinya aterosklerosis. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa gangguan kardiovaskuler pada manusia dan keparahan aterosklerosis pada hewan coba berhubungan dengan meningkatnya kadar kolesterol (Miller, 1990).

Peningkatan kadar kolesterol dalam darah (hiperkolesterolemia) dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium. Sel endothelium mempunyai peran yang sangat penting dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah yaitu dengan melepaskan relaksing faktor (EDRF / *Endothelium Derived Relaxing Factor*) dan kontraktin faktor (EDCF / *Endothelium Derived Contracting Factor*) sehingga dapat dipertahankan keadaan tekanan darah yang normal. Disamping itu endothelium juga berperan pada migrasi dan pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah, menghambat proses koagulasi darah dan merangsang disolusi bekuan darah yang telah terbentuk pada lumen pembuluh darah, dan mengatur adesi dan migrasi sel-sel radang pada dinding pembuluh darah (Inoue *et al.*, 1992).

Kerusakan sel endothelium pada keadaan hiperkolesterolemia dapat terjadi karena adanya peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida, yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL sehingga akan terbentuk gugus hidroksil pada sel endothelium dan otot polos pembuluh darah (Inoue and Nishida, 1998). Hidroksil radikal ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang banyak terdapat pada membran sel sehingga dapat menimbulkan reaksi lipid peroksidasi yang akan menghasilkan lipid peroksida. Oksidasi LDL dan lipid peroksida yang terbentuk akan merusak sel endothelium sehingga dapat menghambat pelepasan EDRF dan menurunkan produksi siklik GMP (Mei and Chen, 1994; Boger and Frolich, 1997). Kerusakan sel endothelium ini dapat dihambat oleh preparat antioksidan seperti

Vitamin E dan Vitamin C (Pierdomenica *et al.*, 1998), dan Probukol (Inoue and Nishida, 1998). Karena mahalnya preparat antioksidan ini dan dengan semakin meningkatnya kasus hiperkolesterolemia yang dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kardiovaskuler seperti atherosklerosis, gagal jantung dan hipertensi yang merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia, maka perlu upaya mencari dan mengembangkan obat baru yang potent, murah, aman dan mudah didapatkan terutama yang berasal dari tanaman sebagai obat alternatif.

Indonesia yang secara alamiah dikaruniai kekayaan alam berupa hutan tropika dengan berbagai keanekaragaman tanaman yang merupakan salah satu megasenter utama keanekaragaman hayati dunia, dengan sekitar 30 – 40.000 jenis tanaman dan kurang lebih 9000 spesies mempunyai khasiat sebagai tanaman obat tradisional. Belum terjangkaunya obat modern oleh seluruh lapisan masyarakat, maka kemungkinan pemanfaatan obat tradisional perlu dijajaki untuk menunjang pemakaian obat modern, dengan syarat bahwa obat tradisional tersebut terbukti berkhasiat dan aman. Pemerintah telah mengambil kebijaksanaan dalam rangka pembudidayaan tumbuhan obat tradisional, baik dalam bentuk jamu, fitofarmaka ataupun sebagai bahan obat alam yang berasal dari tanaman.

Salah satu tanaman obat yang diduga mengandung bahan aktif yang berkhasiat sebagai antioksidan adalah temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) yang banyak tumbuh diberbagai daerah di Indonesia. Pada penelitian pendahuluan, kami menunjukkan bahwa ekstrak temu lawak dapat menurunkan kadar LDL, meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar total kolesterol pada tikus hiperkolesterolemia (Sudjarwo, 1997). Pada temu lawak ini telah berhasil diisolasi bahan aktifnya yaitu *Curcuminoid* yang terdiri dari *Curcumine*, *beta curcumene*, *alpha curcumene*, *xanthorrhizol* dan *germacron*. Dan telah dilaporkan bahwa Curcumine yang diisolasi dari temu lawak ini mempunyai efek antioksidan (Rajakumar and Rao, 1994; Brouet and Oshima, 1995; Osawa *et al.*, 1995), dapat menghambat proses lipid peroksidasi (Sreejayan and Rao, 1994) dan dapat menurunkan kadar LDL, meningkatkan kadar HDL serta menurunkan kadar trigliserida (Piya chaturawat and Suksamram, 1997).

Berdasarkan berbagai uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai potensi dan mekanisme kerja curcumin yang diisolasi dari temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) untuk proteksi sel endothelium pada hiperkolesterolemia, sehingga dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu obat yang berasal dari tumbuhan sebagai obat alternatif yang efektif, murah, aman dan mudah didapatkan yang

dapat digunakan untuk mencegah kerusakan sel endothelium seperti pada aterosklerosis, hipertensi, diabetes dan hiperkolesterolemia.

I.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- a. Apakah Curcumine yang diisolasi dari temulawak dapat menurunkan kadarMDA (*Malondialdehyde*) pada kelinci hiperkolesterolemia
- b. Apakah Curcumine yang diisolasi dari temulawak dapat meningkatkan penglepasan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dari sel endothelium pada kelinci hiperkolesterolemia
- c. Apakah Curcumine yang diisolasi dari temulawak dapat meningkatkan kadar siklik GMP pada kelinci hiperkolesterolemia

I.3. Hipotesis :

Curcumine dapat menurunkan kadar MDA, meningkatkan penglepasan EDRF dan dapat meningkatkan kadar c GMP pada kelinci hiperkolesterolemia.

BAB II

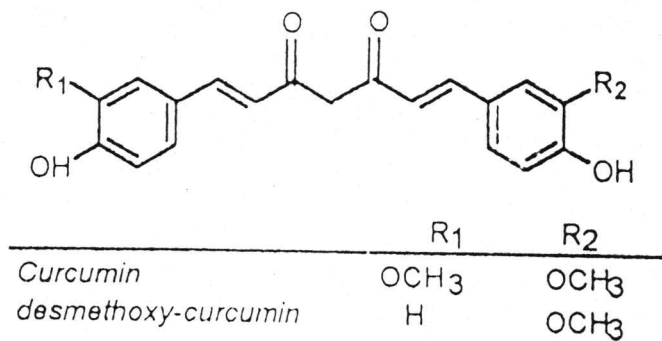
TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Tinjauan Tentang Curcumine

Curcumine merupakan salah satu bahan aktif yang diisolasi dari temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti di Indonesia. Di Jawa sering tumbuh liar di pekarangan-pekarangan, pinggir jalan dan lereng-lereng sungai. Rimpangnya menjadi komoditi penting sejak dahulu sebagai bahan jamu, penghasil zat warna dan aromatikum. Secara tradisional rimpang temulawak digunakan untuk peluruh batu empedu, pelancar asi, pelancar pen cernakan, penurun panas, peluruh batu ginjal, menurunkan kolesterol dan untuk merangsang nafsu makan.

II.1.1 Struktur dan sifat kimia Curcumine

Curcumine atau *bis-(4-hydroxy-3-methoxy-cinnamoyl)-methane* yang juga dikenal sebagai *diferuloyl-methane*. Struktur kimia dari curcumine dapat terlihat pada gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Struktur Kimia Curcumine (Sumber Sudarsono *et al* 1996 Dalam Tumbuhan Obat)

Curcumine berupa kristal berwarna kuning gelap, tidak larut dalam air atau eter, larut dalam alkohol. Dalam larutan basa Curcumine menghasilkan larutan yang berwarna merah kecoklatan yang apabila ditambahkan larutan asam akan berubah warna menjadi kuning.

II.1.2 Efek biologik Curcumine

Data penelitian pada hewan coba (anjing) curcumine mempunyai sifat merangsang produksi empedu dan sekresi pankreas (Stecher, 1978). Pemberian curcumine 0.1 - 0.5 % pada tikus selama 7 hari dapat menyebabkan penurunan kadar kolesterol dalam darah (Hadi, 1985).

Curcumine, natrium curcumine dan turunan semisintetiknya *feruloyl-4-hydroxycinnamoyl-methane* dan *bis-4-hydroxycinnamoyl-methane* mempunyai efek anti radang dan dapat menurunkan kadar SGPT (Hadi, 1985). Dan juga telah dilaporkan bahwa curcumine yang diisolasi dari temu lawak ini mempunyai efek antioksidan (Rajakumar and Rao, 1994; Brouet and Oshima, 1995; Osawa *et al.*, 1995), dapat menghambat proses lipid peroksidasi (Sreejayan and Rao, 1994, 1994) dan dapat menurunkan kadar LDL, meningkatkan kadar HDL serta menurunkan kadar trigliserida (Piyachaturawat and Suksamram, 1997).

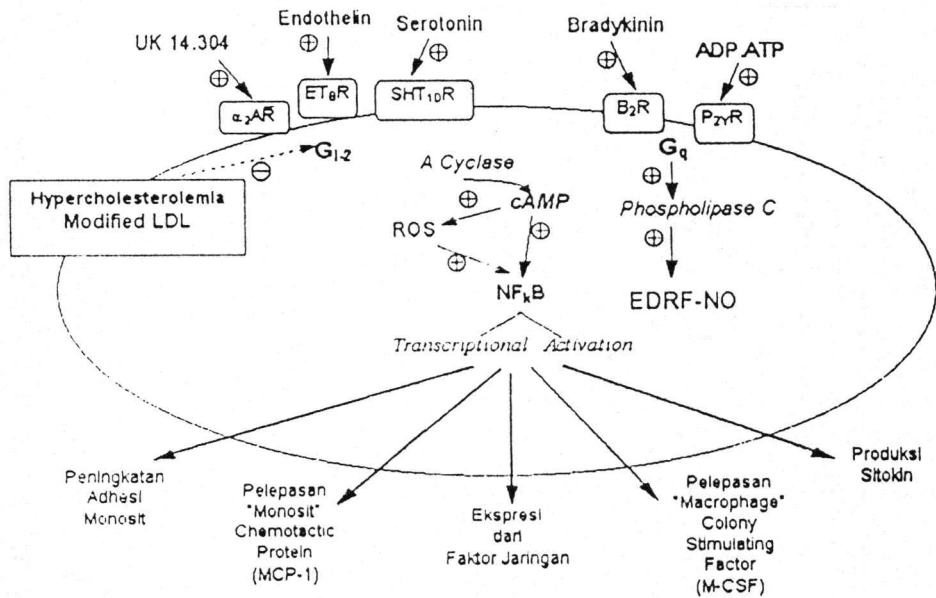
II.2. Tinjauan Tentang Endothelium

Sel endothelium mempunyai peran yang sangat penting dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah dan fungsi organ. Karena letaknya maka endothelium bukan hanya mengatur fungsi dinding pembuluh darah dan jaringan sekitarnya tetapi juga pada aktivitas sirkulasi sel dan konsentrasi dari mediator dalam sirkulasi seperti endothelin, angiotensin, bradikinin, serotonin, katekolamin dan adenosin. Sel endothelium dapat melepaskan Prostasiklin dan Nitrik Oksid sehingga dapat terjadi relaksasi otot polos pembuluh darah. Endothelium berperan untuk proteksi dan mempertahankan fungsi fisiologi dari dinding pembuluh darah yaitu menghambat kontraksi, dan migrasi serta pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah. Endothelium juga aktif menghambat proses koagulasi dan menyebabkan fibrinolisis. Endothelium dapat mencegah terjadinya migrasi dari sel radang ke dalam dinding pembuluh darah (Flavahan, 1992).

II.2.1 Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)

Pada tahun 1980, Furchgott dan Zawadzki melaporkan bahwa relaksasi otot polos pembuluh darah yang disebabkan oleh asetilkolin tergantung adanya endothelium. Hal ini membuktikan bahwa endothelium dapat melepaskan mediator vasoaktif yang diberi nama EDRF. EDRF mempunyai waktu panuh hanya beberapa detik dan telah dilaporkan bahwa EDRF ini adalah NO (Nitrik Oksid) karena EDRF mempunyai struktur dan sifat kimia serta aktivitas biologis yang sama dengan NO (Palmer *et al.*, 1987). Relaksasi

yang tergantung adanya endothelium dapat terlihat pada vena, arteri dan pembuluh darah kecil yang terjadi akibat adanya berbagai rangsangan seperti asetilkolin, thrombin, endothelin, substansi P, histamin, kalsium ionofore A23187 dan bradikinin. Rangsangan lain dapat berupa hipoksia, meningkatnya aliran darah dan rangsangan listrik.



Gambar 2. Proses transduksi signal sel endothelium
(Sumber: Flavahan et al 1992)

Pelepasan EDRF dari sel endothelium akan mengaktifkan guanil siklase sehingga dapat menyebabkan peningkatan produksi siklik GMP yang dapat menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah.. Disamping itu EDRF juga mempunyai efek langsung pada kalium chanel sehingga dapat menyebabkan hiperpolarisasi. Relaksasi otot polos akibat pelepasan EDRF ini dapat dihambat oleh metilen blue (penghambat guanil siklase), hemoglobin (pengikat EDRF) dan L-arginin analog (penghambat pembentukan NO).

EDRF dapat menghambat oksidasi LDL sebagai mediator aterogenik, Kemampuan kerja EDRF untuk menghambat terjadinya lesi aterosklerosis ini ditunjukkan oleh kemampuan L-arginin yang merupakan prekursor EDRF untuk menghambat terjadinya lesi (Flavahan,1992).

EDRF yang dilepaskan dari sel endothelium, disintesis dari L-arginin dengan bantuan enzim NO sintase (NOS). Pada sintesis ini L-arginin mula-mula akan

dihidrolisis menjadi *N-hidroksil-L-arginin* dan kemudian akan teroksidasi dan menghasilkan NO dan sitrulin.

II.2.2 Peran Endothelium pada gangguan kardiovaskuler

EDRF yang dilepaskan oleh sel endothelium mempunyai peran penting dalam mengatur tonus vaskuler dan menjaga aliran darah koroner selama ada peningkatan kebutuhan metabolik. Gangguan pelepasan EDRF dari sel endothelium dapat terjadi karena adanya hambatan pembentukan EDRF, adanya degradasi sel endothelium, penurunan sensitivitas pada pembentukan NO atau gabungan dari faktor tersebut. Gangguan ini dapat menimbulkan keadaan patologi yang sering disebut disfungsi endothel (Sosmen *et al.*, 1988).

Secara anatomi, letak sel endothelium sangat strategis yaitu antara aliran darah (lumen) dan otot polos vaskuler (lapisan media dinding pembuluh darah) sehingga sel endothelium dapat berfungsi sebagai target organ dan modulator dari tekanan darah. Gangguan fungsi endothelium seperti menurunnya pelepasan EDRF atau meningkatnya pelepasan EDCF merupakan faktor penyebab terjadinya kondisi patologi yang diantaranya adalah gangguan kardiovaskuler (Drexler, 1996) seperti berikut dibawah ini:

a. Hipertensi

Sel endothelium sangat berperan terhadap meningkatnya tekanan darah. Pengaruh fisik seperti shear stress, aliran darah yang meningkat, kelenturan dan tekanan dapat menyebabkan gangguan fungsi dari sel endothelium. Perubahan morfologi dan gangguan fungsi dari sel endothelium ini sangat berhubungan erat dengan terjadinya hipertensi. Pada hipertensi, sel endothelium dalam aliran darah jumlahnya meningkat, ada penonjolan dinding pembuluh darah kedalam lumen, ada peningkatan fibrin pada ruang subintimal dan terdapat interaksi antara platelet dan monosit dengan sel endothelium. Keseimbangan antara mediator yang dilepaskan oleh sel endothelium yang dapat menyebabkan relaksasi dengan mediator yang dapat menyebabkan kontraksi sangat mempengaruhi terjadinya gangguan kardiovaskuler, terutama hipertensi (Luscher and Tanner, 1993).

b. Hiperkolesterolemia dan Aterosklerosis

Pada hiperkolesterolemia dan aterosklerosis dapat terjadi kerusakan sel endothelium. Hal ini karena adanya peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida, yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL sehingga akan terbentuk gugus hidroksil pada sel endothelium dan otot polos pembuluh darah. Hidroksil radikal ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang banyak terdapat pada membran sel sehingga dapat menimbulkan reaksi lipid peroksidasi yang akan menghasilkan lipid peroksida (Inoue and Nishida, 1998). Oksidasi LDL dan lipid peroksida yang terbentuk akan merusak sel endothelium sehingga dapat menghambat pelepasan EDRF dan menurunkan produksi cyclic GMP (Mei and Chen, 1994; Boger and Frolich, 1997).

Pada hiperkolesterolemia dan atherosklerosis, kerusakan endothelium dapat dicegah dengan cara: pengobatan untuk menurunkan kadar kolesterol, konsumsi makanan yang kaya minyak ikan, pemberian L-arginin sebagai prekursor NO dan mencegah degradasi NO melalui inaktivasi radikal bebas superoksida dengan preparat antioksidan dan pemberian superoksida dismutase. Langkah ini penting untuk mencegah terjadinya penyakit kardiovaskuler (Meredith *et al.*, 1993).

II.2.3. Disfungsi sel endothelium

Disfungsi sel endothelium dapat menekan aktifitas EDRF dan hilangnya efek proteksi sehingga dapat mempercepat terjadinya proses aterosklerosis pada hewan percobaan (Flavahan *et al.*, 1991). Hambatan Nitrik Oksida Sintase (NOS) oleh L-NAME dapat mempercepat perkembangan lesi aterosklerosis, sebaliknya pemberian L-arginine yang merupakan prekursor dari EDRF dapat menekan lesi intima (Cooke *et al.*, 1992). Pada babi hiperkolesterolemia, penurunan aktivitas EDRF berhubungan dengan menurunnya selektivitas dari respon sel endothelium yang ditimbulkan oleh agonist tertentu (Simokawa *et al.*, 1990). Disfungsi sel endothelium seperti diatas dapat terjadi pada aorta kelinci yang di buat menjadi hiperkolesterolemia sehingga dapat menghambat respon dari asetikholin dan serotin yang tergantung adanya sel endothelium.

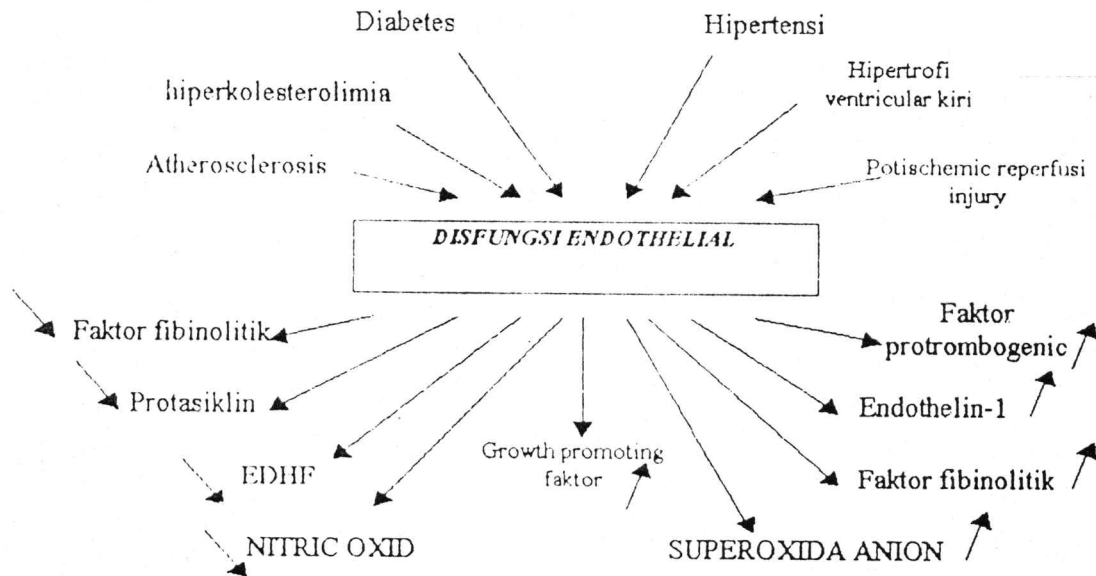
Disfungsi sel endothelium dapat disebabkan oleh adanya modifikasi LDL dan lipid yang berasal dari lipoprotein yang dapat menghambat relaksasi yang tergantung adanya endothelium dan efek hambatan ini diperantarai oleh *lysophosphatidylcholine* (*lyso-PC*) yang berhubungan dengan partikel oksidasi LDL. Pengaruh hambatan oleh oksidasi LDL ini dapat dihambat oleh HDL (Matsuda *et al.*, 1993). Pada arteri koroner

babi hiperkolesterolemia, *lyso-PC* secara selektif menghambat relaksasi yang tergantung endothelium karena adanya aktivasi Gi-2 protein pada sel endothelium.

Lyso-Pc atau oksidasi LDL menghambat peningkatan kalsium intrasel yang ditimbulkan oleh asetilkolin pada sel endothelium aorta kelinci, oleh thrombin atau histamin pada sel endothelium *vena umbilicus* manusia atau oleh bradikinin pada sel endothelium aorta sapi (Miwa *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1992). Efek hambatan ini berhubungan dengan hambatan peningkatan produksi IP3 yang disebabkan oleh agonis. Penelitian selanjutnya juga menunjukkan bahwa efek hambatan dari *lyso-PC* atau oksidasi LDL pada relaksasi yang tergantung endothelium disebabkan oleh adanya hambatan signal transduksi pada sel endothelium. Mekanisme hambatan lipid pada signal transduksi endothelium bisa melibatkan aktivasi dari protein kinase C. Protein kinase C dapat menyebabkan fosforilasi Gi-protein yang mengakibatkan hambatan pada fungsi endothelium. Aktivasi protein kinase C oleh phorbol ester menyebabkan hambatan pada respon endothelium yang tergantung adanya Gi-protein (Flavahan *et al.*, 1991).

Gangguan signal Gi-2 protein pada endothelium bisa mengurangi aktivitas dari EDRF yang dapat terjadi pada proses awal aterosklerosis atau pada pemberian modifikasi lipoprotein pada sel endothelium. Menurunnya aktivitas EDRF akan mengurangi peran proteksi dari endothelium dan selanjutnya bisa mempercepat proses atherosklerosis. Gangguan signal dari Gi-2 protein bisa juga menyebabkan endothelium secara aktif menimbulkan penyakit.

Gi-2 protein sel endothelium dapat menghambat adenil siklase yang menyebabkan menurunnya kadar siklik AMP pada endothelium. Meningkatnya kadar siklik AMP pada sel endothelium dapat ditimbulkan oleh aktivasi Gs protein (isoproterenol, cholera toxin) atau oleh analog siklik AMP (*dibutyryl cyclic AMP*). Efek proaterogenik diawali oleh adanya gangguan signal Gi-2 protein yang bisa diakibatkan adanya aktivasi yang tergantung siklik AMP dari faktor transkripsi NFkB. Faktor transkripsi ini mempunyai peran yang sangat penting pada respon atherogenik endothelium dan NFkB ini terletak pada faktor yang merangsang koloni makrophage, faktor pertumbuhan sitokin, protein chemotaktik dan pada gene pemacu adhesi monosit.



Gambar 3. Disfungsi sel endothelium (Sumber: Wijaya,1998)

Telah dilaporkan bahwa menurunnya aktivitas EDRF sebagai akibat dari rusaknya sel endothelium yang disebabkan oleh meningkatnya aktivitas superoksida karena adanya lipoprotein atau hiperkolesterolemia (Ohara *et al.*, 1992). Pada hiperkolesterolemia, sel intima dapat menghasilkan superoksida yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel normal dan pemberian antioksidan dapat menghambat proses aterosklerosis dan dapat meningkatkan aktivitas EDRF (Simon *et al.*, 1993).

II.3. Tinjauan Tentang Radikal Bebas

Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar merupakan oksidan endogen yang terbentuk dalam tubuh kita sendiri, yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen compound/ROC, Reactive OxygeSpecies/ROS*). ROS dapat berbentuk radikal seperti radikal hidroksil (OH), Radikal peroksil (OOH) dan superoksida (O_2^-) (Suryohudoyo, 1997).

ROS merupakan oksidan yang sangat kuat yang dapat bereaksi dengan semua senyawa yang dapat melepaskan elektron. Reaksi dari ROS ini yang paling penting adalah terhadap asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang merupakan komponen membran sel, DNA yang merupakan perangkat genetik sel, dan protein yang melaksanakan berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrik ekstrasel serta sitoskeleton.

II.3.1 Efek radikal bebas terhadap asam lemak tak jenuh

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh jamak. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh jamak sehingga dapat terbentuk lipid peroksid yang bersifat toksik terhadap sel dan dapat mengakibatkan kerusakan membran sel (Evan and Bruedorfer, 1992).

II.3.2 Efek radikal bebas terhadap DNA

Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tidak terlalu parah, maka masih dapat diperbaiki oleh sistem DNA (DNA repair sistem). Akan tetapi jika kerusakannya terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus di banyak tempat, maka kerusakan ini tidak dapat diperbaiki, akhirnya sel akan mati.

Pada perbaikan DNA, nukleotida yang biasanya rusak, dapat diganti namun sering tak sempurna, sehingga terjadi mutasi. Bila mutasi ini terjadi pada jenis gen khusus, yaitu proto onko-gen atau anti onkogen maka dapat menimbulkan kanker. Rantai DNA yang terputus dapat disambung kembali, tetapi penyambungannya sering kurang sempurna sehingga terjadi translokasi (Evan and Bruedorfer, 1992).

II.3.3 Efek radikal bebas terhadap protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein, khususnya asam amino sistein yang mengandung gugusan sulfhidril (-SH).

Pembentukan ikatan disulfida menimbulkan ikatan intra maupun antar molekul protein sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (misalnya enzim kehilangan aktivitasnya). Protein dapat juga bereaksi dengan aldehyd hasil hasil peroksidasi lipid sehingga menimbulkan apa yang disebut AGE (*Advanced Glycoxylated Endproducts*) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Evan and Bruedorfer, 1992).

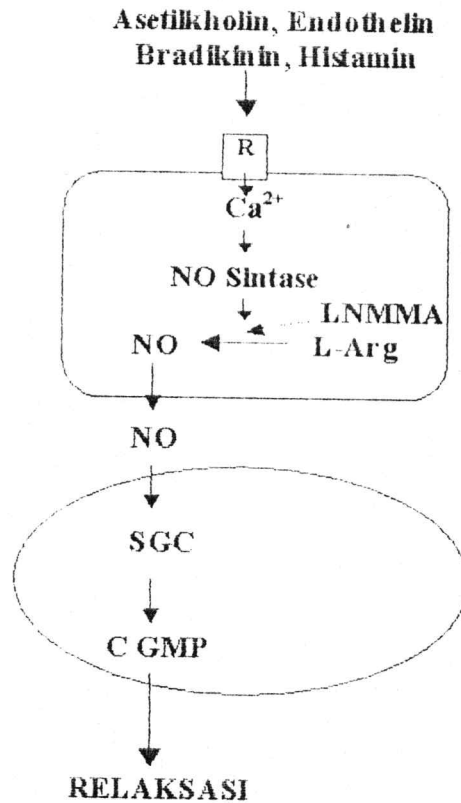
II.4 Malondialdehyde (MDA)

Dengan semakin banyaknya laporan dari berbagai penelitian yang menunjukkan adanya keterlibatan dari radikal bebas pada berbagai penyakit, maka salah satu cara untuk mengetahui keterlibatan radikal bebas ini, digunakan metode pengukuran kadar MDA. Hal ini karena malondialdehyde merupakan bentuk senyawa yang paling banyak

ditemukan sebagai hasil dari lipid peroksidasi. Pada berbagai jaringan, MDA akan dimetabolisme melalui proses oksidasi oleh aldehyde dehidrogenase menjadi asam malonat yang merupakan inhibitor kompetitif dengan suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Selanjutnya melalui proses dekarboksilasi, asam malonat akan berubah menjadi acetaldehyde.

II.5 Siklik GMP (c GMP)

Furchgott *et al* (1984) dan Sudjarwo *et al* (1992) melaporkan bahwa relaksasi yang tergantung pada endothelium yang disebabkan oleh asetilkolin, histamin, endothelin dan ionophore A23187 berhubungan dengan meningkatnya kadar c GMP pada aorta tikus dan kelinci. Kerusakan endothelium ini dapat menghambat relaksasi otot polos pembuluh darah dan kadar c GMP.



Gambar 4. Mekanisme relaksasi otot polos pembuluh darah dari Asetilkolin, endothelin, bradikinin dan histamin

Pada endothelium pembuluh darah aorta, asetilkolin dan endothelin dapat menyebabkan peningkatan kalsium influk dan kalsium release sehingga dapat

mengakibatkan kalsium intrasel juga akan meningkat. Peningkatan kalsium intrasel akan mengaktifasi sintase nitrik oksid yang selanjutnya dapat menyebabkan pembentukan dan pelepasan nitrik oksid /EDRF. Inhibitor dari sintase nitrik oksid seperti LNMMA dapat menghambat pembentukan EDRF tetapi tidak dapat menghambat kalsium intrasel endothelium (Sudjarwo *et al.*, 1992). Pada otot polos pembuluh darah, EDRF akan mengaktifasi adenil siklase yang dapat mengakibatkan terjadinya perubahan GTP menjadi c GMP sehingga produksi c GMP meningkat. Peningkatan siklik GMP dapat menyebabkan relaksasi otot polos. Inhibitor dari guanyl siklase seperti metilen blue dan pengosongan kalsium ekstrasel dapat menghambat relaksasi otot polos pembuluh darah karena adanya hambatan produksi c GMP (Sudjarwo *et al.*, 1992)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III.1. Tujuan Penelitian

Dengan semakin meningkatnya kasus hiperkholesterolemia yang dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kardiovaskuler seperti atherosklerosis, gagal jantung dan hipertensi yang merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia. Untuk mencegah kerusakan sel endothelium maka pada penelitian ini secara umum bertujuan untuk mencari obat alternatif dan mengembangkan obat yang potent, murah, aman dan mudah didapatkan terutama yang berasal dari tanaman, salah satu diantaranya adalah curcumin yang diisolasi dari tanaman temu lawak, sehingga dapat digunakan untuk mencegah terjadinya gangguan kardiovaskuler. Sedangkan secara khusus penelitian ini bertujuan :

- a. Membuktikan bahwa Curcumin yang diisolasi dari temulawak dapat menurunkan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada kelinci hiperkholesterolemia
- b. Membuktikan bahwa Curcumin yang diisolasi dari temulawak dapat meningkatkan pelepasan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dari sel endothelium pada kelinci hiperkholesterolemia
- c. Membuktikan bahwa Curcumin yang diisolasi dari temulawak dapat meningkatkan produksi siklik GMP pada kelinci hiperkholesterolemia

III.2. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk :

- a. Memberikan informasi bahwa Curcumine yang di isolasi dari tanaman temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk mencegah kerusakan sel endothelium sehingga dapat digunakan untuk menghambat terjadinya gangguan kardiovaskuler.
- b. Curcumine yang di isolasi dari tanaman temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) dapat digunakan untuk menurunkan kadar Malondialdehyde dan meningkatkan EDRF release serta meningkatkan kadar siklik GMP oleh sel endothelium pada hiperkholesterolemia
- c. Curcumine yang di isolasi dari tanaman temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*) dapat dikembangkan lebih lanjut kedalam proses semi sintesa

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

IV.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi FK UNAIR Surabaya dari tanggal 24 Mei 2002 sampai tanggal 20 september 2002.

IV.2. Materi Penelitian

IV.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah Noradrenalin, Asetilkolin, Curcumine yang diperoleh dari Sigma chemical industries dan kolesterol didapatkan dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Tokyo Jepang. Sedangkan larutan krebs dibuat dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 Mm, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0.01 mM dan glukose 5,5 mM dan diberi O₂ 95 % dan CO₂ 5 %, KIT cyclic GMP dari Cayman chemical company Ann Arbor, MI, USA.

IV.2.2 Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci jantan dengan berat badan 1.5 – 2 kg yang diperoleh dari peternakan kelinci di Batu, Malang.

IV.2.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah Isolated organ bath, rekorder, amplifier, spektrofotometer, ELISA.

IV.3. Prosedure Penelitian

IV.3.1. Induksi hiperkholesterolemia

Untuk membuat hyperkholesterolemia pada kelinci dapat dilakukan dengan cara Inoue and Nishida (1998) yaitu dengan cara memberi makanan yang dicampur dengan kolesterol 2 % selama 8 minggu.

IV.3.2. Perlakuan terhadap hewan coba

24 ekor kelinci setelah diadaptasikan selama satu minggu, ditimbang berat badannya dan secara acak dibagi menjadi 4 kelompok sebagai berikut :

Kelompok Kontrol Negatif :

6 ekor kelinci diberi makanan tanpa kolesterol dan diberi pelarut curcumin

Kelompok Kontrol Positif :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi pelarut curcumin

Kelompok Perlakuan I :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumin dengan dosis 20 mg/kg berat badan

Kelompok Perlakuan II :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumin dengan dosis 40 mg/kg berat badan

Setelah 8 minggu dari perlakuan, pada semua hewan percobaan diambil darahnya untuk diperiksa kadar MDA (Malondialdehyde) dan selanjutnya semua hewan percobaan dibunuh dan diambil pembuluh darahnya yaitu aorta untuk diperiksa besarnya EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dan cyclic GMP dari sel endothelium.

IV.3.3 Pemeriksaan sampel**a. Pemeriksaan kadar Malondialdehyde (MDA)**

Penetapan kadar Malondialdehyde dalam darah dilakukan dengan metode Espinosa-mansilla, 1993. Pengukurannya berdasarkan jumlah malondialdehyde yang bereaksi dengan reagen asam tiobarbiturat. Kadar malondialdehyde yang terdeteksi ini dianggap identik dengan konsentrasi lipid peroksid plasma.

Tahap penetapan kadarnya adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan kurva baku:

Dibuat larutan baku malondialdehyde dengan cara mereaksikan larutan TEP (*1,1,3,3-tetraetoksi propana*) dengan HCl 12 mol/L. Dimasukan aliquot larutan 1,1,3,3-tetraetoksi propana yang setara dengan 1,25-12,5 malondialdehyde, 1 ml 12 mol/L HCl dan 12 ml 0,03 mol/L larutan TBA kedalam labu ukur 25 ml dan encerkan sampai garis tanda dengan air demineralisata. Sampel dipanaskan pada 60 °C selama 60 menit pada penangas air yang ada termostatnya, dan kemudian diamati serapannya pada panjang gelombang 532 nm. Dihitung persamaan garis regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi malondialdehyde dengan serapan.

2. Deproteinasi:

2 ml Asetonitril dicampur dengan 1 ml plasma sampel dan disentrifugasi. Supernatannya disaring melalui kertas saring dengan ukuran 0.4 μm . 1.5 alikuotnya dipindahkan ke labu ukur 25 ml.

3. Prosedure umum:

Kedalam labu ukur yang telah berisi alikuot plasma ditambahkan 1 ml 12 mol/L HCl dan 12 ml 0.03 mol/L larutan TBA dan diencerkan sampai garis tanda dengan air demineralisata. Sampel dipanaskan pada 60 °C selama 60 menit pada penangas air yang ada termostatnya, dan kemudian diamati serapannya pada panjang gelombang 532 nm. Dihitung kadar malondialdehyde dalam plasma dengan menggunakan persamaan garis regresi dari kurva baku larutan malondialdehyde.

b. Pemeriksaan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) release secara in vitro

Pemeriksaan EDRF release dilakukan dengan cara Karaki dan Sudjarwo (1993) yaitu pembuluh darah aorta yang endotheliumnya masih utuh dipisahkan secara cepat dari tubuh kelinci, kemudian dibersihkan dari jaringan lemak dan dipotong dalam bentuk ring dengan lebar 3 mm. Kemudian diinkubasikan kedalam isolated organ bath yang berisi larutan krebs yang terdiri dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0,01 mM dan glukose 5,5 mM dan diberi oksigen 95 % dan CO₂ 5 %. Salah satu ujung aorta di fiksasi pada kait yang terdapat pada organ bath, sedangkan ujung yang lain dihubungkan dengan transduser, amplifier dan recorder untuk mencatat relaksasi dan kontraksi aorta yang terjadi. Kemudian ditambah Noradrenalin 100 nM untuk membuat kontraksi aorta, setelah 10 menit kemudian ditambahkan Asetilkolin dengan konsentrasi 10 nM, 100 nM dan 1 μM . Besarnya relaksasi akibat pemberian Asetilkolin dibagi dengan besarnya kontraksi yang ditimbulkan oleh noradrenalin dan hasilnya dikalikan 100 %. Hasil ini memperlihatkan besarnya EDRF release dari sel endothelium.

c. Pemeriksaan kadar cyclic GMP secara in vitro

Pengukuran cyclic GMP dilakukan dengan cara dari Fujitani (1993) yaitu pembuluh darah aorta dipisahkan secara cepat dari tubuh tikus kemudian dipisahkan dari jaringan lemak dan di inkubasikan kedalam larutan krebs yang terdiri dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0,01 mM

dan glukose 5.5 mM. Kemudian ditambahkan 100 nM Noradrenalin dan setelah 10 menit ditambah lagi dengan asetilkholin 1 μ M. Setelah 1 menit aorta secara cepat dimasukkan kedalam cairan Nitrogen untuk dibekukan. Selanjutnya dipindahkan ke larutan 5 % Trichloroasetic acid dan di homogenasi dengan potter glas dalam putaran-butiran es. Homogenate disentrifuse pada 1700 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diekstrak sebanyak 3 kali dengan menggunakan ether yang dicampur air. Kemudian di label dengan KIT cyclic GMP dari Cayman chemical company Ann Arbor USA.

IV.4. Rancangan Penelitian Dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dan data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA. Apabila hasil perlakuan yang diberikan terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Pengaruh Pemberian Curcumine Terhadap Kadar MDA Dalam Darah Kelinci

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 % selama 8 minggu (kontrol positif), menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kolesterol (kontrol negatif), sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dengan dosis 20 dan 40 mg/kg BB dan diberi makanan yang dicampur dengan kolesterol memperlihatkan adanya penurunan kadar MDA bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 %.

Data hasil penelitian dan kadar MDA yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 1, dan penghitungan statistik kadar MDA tercantum pada lampiran 2. Hasil rata-rata dan simpangan baku dan penghitungan kadar MDA dalam darah kelinci dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata Dan Simpangan Baku Kadar MDA Kelinci dan berbagai kelompok

Kelompok	Kadar MDA ($\mu\text{M/ml}$)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$
Kontrol Negatif	3.0 ± 0.27^a
Kontrol Positif	6.7 ± 0.49^b
Curcumin Dosis 20 mg/kg BB	4.1 ± 0.89^c
Curcumin Dosis 40 mg/kg BB	3.1 ± 0.46^{ad}

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Keterangan :

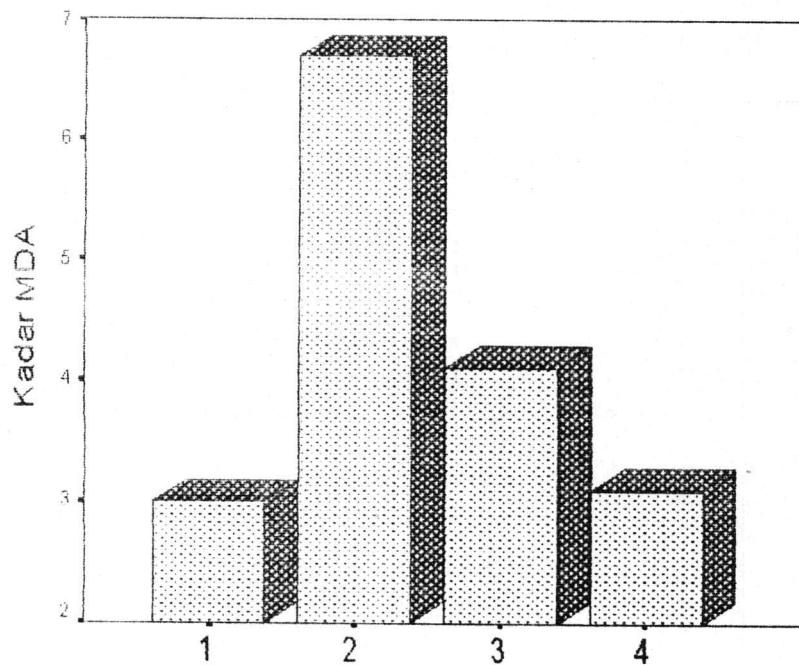
Kontrol Negatif : kelinci diberi makanan tanpa kolesterol

Kontrol Positif : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol

Curcumin Dosis 20 mg/kg BB : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumine dengan dosis 20 mg/kg berat badan

Curcumin Dosis 40 mg/kg BB : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Curcumine dengan dosis 40 mg/kg berat badan

Pada penghitungan statistik dengan uji ANOVA terhadap kadar MDA, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan Uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kolesterol 2 % selama 8 minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA (6.7 ± 0.49) dan pada uji LSD terdapat perbedaan yang sangat nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol (3.0 ± 0.27) dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 20 mg/kg BB (4.1 ± 0.89) dan dosis 40 mg/kg BB (3.1 ± 0.46) pada $p < 0.05$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 40 mg /kg BB memperlihatkan adanya penurunan kadar MDA yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol, tetapi berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang diberi curcumin dosis 20 mg/kg BB.



Gambar 5. Kadar MDA dari plasma kelinci. Kontrol negatif (1), kontrol positif (2), curcumine dosis 20 mg/Kg BB (3) dan curcumine dosis 40 mg/kg BB (4).

Efek curcumine dalam menurunkan kadar MDA tergantung pada dosis yang diberikan, semakin besar dosis curcumin yang diberikan semakin kuat penurunan kadar MDA nya seperti terlihat pada gambar 5 diatas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kolesterol 2% selama 8 minggu pada kelinci menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA. Hasil ini sesuai dengan laporan bahwa pada kelinci yang diberi diet kolesterol 2 % selama 8 minggu dapat menyebabkan kenaikan kadar kolesterol (hiperkolesterolemia) dan dapat terjadi peningkatan produksi superoksida anion dari sel endothelium. Meningkatnya radikal bebas superoksida ini berhubungan dengan meningkatnya lipid peroksidasi plasma yang dapat diukur sebagai Thiobarbitonic acid-reactive substances (TBARS) plasma yang diekspresikan sebagai MDA. Kenaikan produksi superoksida pada hiperkolesterolemia ini karena adanya aktivasi atau kenaikan xanthine oksidase.

Pemberian Curcumin dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA. Hal ini karena Curcumin dapat menyebabkan kenaikan kadar HDL dan meningkatkan ekskresi kolesterol melalui tinja sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Piyachaturawat and Suksamram, 1997). Disamping itu Curcumine juga mempunyai khasiat sebagai antioksidan (Osawa *et al.*, 1995., Priyadarsini, 1997) dan dapat menghambat lipid peroksidasi dalam plasma (Srejayan and Rao, 1994., Cohly *et al.*, 1998). Telah dilaporkan bahwa antioksidan seperti probukol, vitamin C dan vitamin E mempunyai kemampuan menghambat lipid peroksidasi dan modifikasi oksidasi LDL sehingga dapat menghambat kenaikan kadar MDA (Pierdomenica *et al.*, 1998., Inoue and Nishida, 1998).

Baru-baru ini juga ditunjukkan bahwa antioksidan probukol dapat menurunkan pembentukan radikal bebas superoksida dari sel endothelium pembuluh darah pada kelinci hiperkolesterolemia, yang diperlihatkan dengan adanya penurunan TBARS plasma. Mekanisme antioksidan dalam menghambat produksi radikal bebas superoksida masih belum diketahui dengan jelas.

V.2 Pengaruh Pemberian Curcumine Terhadap EDRF

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 % selama 8 minggu, menunjukkan adanya hambatan pelepasan EDRF yang diperlihatkan dengan adanya hambatan relaksasi yang tergantung endothelium pada aorta akibat pemberian asetilkolin bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kolesterol,

sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dengan dosis 20 mg/Kg BB, 40 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan penglepasan EDRF bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 %. Data hasil penelitian dari penglepasan EDRF yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 3 dan dan penghitungan statistik penglepasan EDRF tercantum pada lampiran 4. Hasil rata-rata dan simpangan baku dari penghitungan penglepasan EDRF dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Rata-rata dan simpangan baku relaksasi dari asetilkolin pada aorta keiinci.

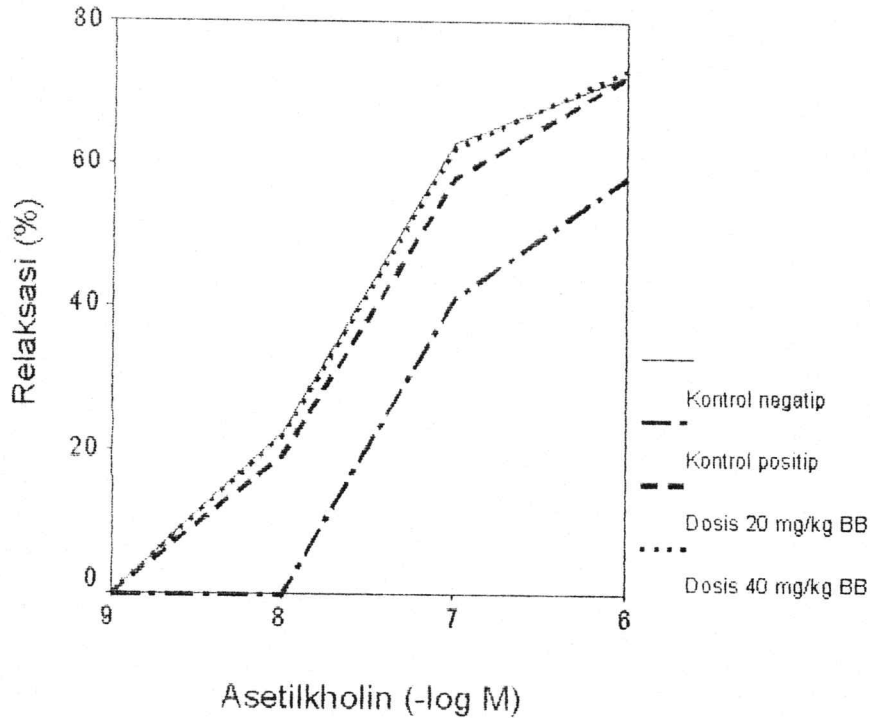
KELOMPOK	Efek Relaksasi Asetilkolin (%) Dosis		
	X ± SD		
	10 nM	100 nM	1 µM
Kontrol Negatif	22.5 ± 0.89 ^a	62.9 ± 4.4 ^c	72.5 ± 4.3 ^e
Kontrol Positif	0 ^b	41.1 ± 2.1 ^d	57.9 ± 1.9 ^f
Curcumine Dosis 20 mg/Kg BB	19.1 ± 2.5 ^a	57.9 ± 4.1 ^c	57.9 ± 4.1 ^{cf}
Curcumine Dosis 20 mg/Kg BB	21.9 ± 2.2 ^a	62.3 ± 5.8 ^c	73.3 ± 0.9 ^e

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Pemberian asetilkolin 10 nM, 100 nM, 1 µM dapat menyebabkan relaksasi yang tergantung endothelium pada aorta dari semua kelompok. Semakin besar dosis asetilkolin yang diberikan semakin kuat relaksasi yang ditimbulkannya..

Pada uji statistik analisa varian terhadap penglepasan EDRF, menunjukan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan Uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kolesterol 2 % selama 8 minggu menunjukan adanya hambatan relaksasi aorta yang disebabkan oleh asetilkolin. Pada uji LSD terdapat perbedaan yang sangat nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 20, 40 mg/kg BB pada $p < 0.05$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 40 mg /kg BB memperlihatkan adanya peningkatan relaksasi yang tergantung adanya endothelium akibat pemberian asetilkolin yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol dan juga

dengan kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 20 mg/kg BB pada $p < 0.05$ seperti terlihat pada gambar 6.



Gambar 6. Relaksasi tergantung adanya endothelium yang disebabkan oleh asetilkholin (10 nM, 100 nM, 1 μ M) pada aorta kelinci yang dikontraksi dengan Noradrenalin 1 μ M.

Berdasarkan hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa pemberian curcumine dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/kg BB dapat menghambat kerusakan sel endothelium pada kelinci hiperkholesterolemia sehingga pemberian curcumin dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/Kg BB mampu meningkatkan relaksasi dari asetilkholin pada aorta yang tergantung adanya endothelium. Efek proteksi dari curcumin terhadap kerusakan sel endothelium pada hiperkholesterolemia ini karena curcumine mempunyai efek antioksidan sehingga mampu menghambat pembentukan radikal bebas superoksid dan menghambat proses lipid peroksidasi. Hal ini akan menyebabkan peningkatan pelepasan EDRF dan produksi siklik GMP. Inoue and Nishida (1998) melaporkan bahwa pemberian antioksidan probukol pada kelinci hiperkholesterolemia dapat menghambat lipid

peroksidasi dan oksidasi LDL sehingga antioksidan probukol mampu meningkatkan relaksasi yang tergantung adanya endothelium. Juga telah dilaporkan bahwa pada keadaan hiperkholesterolemia dapat merangsang pembentukan radikal bebas superoksid pada sel endothelium sehingga superoksid ini secara langsung dapat menginaktivasi EDRF dan juga dapat meningkatkan oksidasi LDL yang dapat merusak sel endothelium. Pada hiperkholesterolemia, sel intima dapat menghasilkan superoksid yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel normal dan pemberian antioksidan dapat menghambat proses atherosklerosis dan dapat meningkatkan aktivitas EDRF (Simon *et al.*, 1993).

Kerusakan sel endothelium akibat adanya oksidasi LDL dan lipid yang berasal dari lipoprotein sehingga dapat menghambat relaksasi yang tergantung adanya endothelium dan efek hambatan ini diperantarai oleh lysophosphatidylcholine (lyso-PC). Pengaruh hambatan oleh oksidasi LDL ini dapat dihambat oleh HDL (Matsuda *et al.*, 1993). Pada arteri koroner babi hiperkholesterolemia, lyso-PC secara selektif menghambat relaksasi yang tergantung endothelium karena adanya aktivasi Gi-2 protein pada sel endothelium.

Lyso-PC atau oksidasi LDL menghambat peningkatan calcium intrasel yang ditimbulkan oleh asetilkolin pada sel endothelium aorta kelinci, oleh thrombin atau histamin pada sel endothelium vena umbilicus manusia atau oleh bradikinin pada sel endothelium aorta sapi (Miwa *et al.*, 1993 ; Inoue *et al.*, 1992). Efek hambatan ini berhubungan dengan hambatan peningkatan produksi IP3 yang disebabkan oleh agonis. Penelitian selanjutnya juga menunjukkan bahwa efek hambatan dari lyso-PC atau oksidasi LDL pada relaksasi yang tergantung endothelium disebabkan oleh adanya hambatan signal transduksi pada sel endothelium. Mekanisme hambatan lipid pada signal transduksi endothelium bisa melibatkan aktivasi dari protein kinase C. Protein kinase C dapat menyebabkan fosforilasi Gi-protein yang mengakibatkan hambatan pada fungsi endothelium dan aktivasi protein kinase C oleh phorbol ester menyebabkan hambatan pada respon endothelium yang tergantung adanya Gi-protein (Flavahan *et al.*, 1991).

Gangguan signal Gi-2 protein pada endothelium bisa mengurangi aktivitas dari EDRF yang dapat terjadi pada proses awal atherosklerosis atau pada pemberian modifikasi lipoprotein pada sel endothelium. Menurunnya aktivitas EDRF akan mengurangi peran proteksi dari endothelium dan selanjutnya bisa mempercepat proses atherosklerosis.

V.3. Pengaruh Pemberian Curcumine Terhadap kadar c GMP

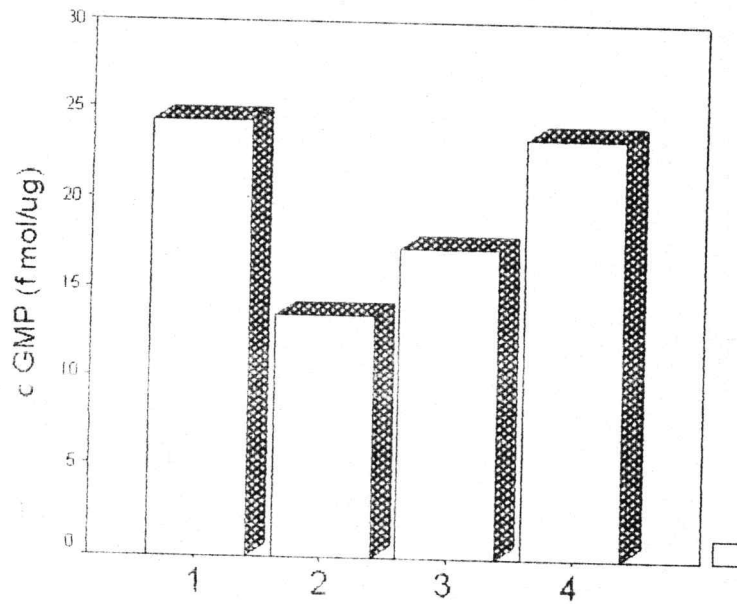
Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kholesterol 2 % selama 8 minggu, menunjukkan adanya hambatan pada asetilkholin untuk memproduksi c GMP pada aorta bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kholesterol, sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dengan dosis 20 mg/Kg BB, 40 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan produksi c GMP bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang hanya diberi makanan yang dicampur kholesterol 2 %. Data hasil penelitian dari kadar c GMP yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 4 dan dan penghitungan statistik kadar c GMP tercantum pada lampiran 5. Hasil rata-rata dan simpangan baku dan penghitungan penglepasan EDRF dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Rata-rata dan simpangan baku kadar c GMP dari berbagai kelompok.

Kelompok	Kadar c GMP (fmol/ μ g) dari Asetilkholin 1 μ M
Kontrol Negatif	24.3 \pm 0.82 ^a
Kontrol Positif	13.5 \pm 0.55 ^b
Curcumin Dosis 20 mg/kg BB	17.3 \pm 0.82 ^c
Curcumin Dosis 40 mg/kg BB	23.5 \pm 0.55 ^{ad}

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Pada uji statistik analisa varian terhadap kadar c GMP, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan Uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholesterol 2 % selama 8 minggu menunjukkan adanya hambatan pada asetilkholin untuk memproduksi c GMP yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kholesterol dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi curcumin dosis 20, 40 mg/kg BB pada $p < 0.01$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi curcumine dosis 40 mg /kg BB memperlihatkan adanya peningkatan kadar c GMP yang diproduksi oleh asetilkholin yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kholesterol dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi curcumin dosis 20 mg/kg BB pada $p < 0.01$ seperti terlihat pada gambar 7.



Gambar 7. Kadar c GMP yang diproduksi oleh asetilkolin $1 \mu\text{M}$ pada aorta kelinci yang dikontraksi dengan Noradrenalin $1 \mu\text{M}$. Kontrol negatif (1), kontrol positif (2), curcumine dosis 20 mg/kg BB (3) dan curcumine dosis 40 mg/kg BB (4).

Berdasarkan hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa pemberian curcumine dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/kg BB dapat menghambat kerusakan sel endothelium pada kelinci hyperkholesterolemia yang dapat menyebabkan asetilkolin dapat meningkatkan pelepasan EDRF dari sel endothelium. EDRF ini akan mengaktivasi adenil siklase sehingga akan terjadi perubahan ATP menjadi C GMP, akibatnya terjadi peningkatan c GMP yang dapat merelaksasi otot polos aorta. Hasil ini sesuai dengan laporan dari Sudjarwo *et al* (1992) yang melakukan penelitian pada aorta tikus yang endotheliumnya dirusak kemudian diberi asetilkolin, hasilnya menunjukkan bahwa asetilkolin dapat menyebabkan terjadinya hambatan pelepasan EDRF dan dapat menurunkan kadar c GMP sehingga pemberian asetilkolin pada endothelium aorta tikus yang dirusak tidak dapat menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan :

1. Pemberian curcumine dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/Kg BB dapat menurunkan kadar MDA pada kelinci hiperkolesterolemia.
2. Pemberian curcumine dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/Kg BB dapat meningkatkan penglepasan EDRF pada kelinci hiperkolesterolemia yang diperlihatkan dengan adanya peningkatan relaksasi pembuluh darah dari asetilkolin yang tergantung adanya endothelium.
3. Pemberian curcumin dosis 20 mg/kg BB dan 40 mg/Kg BB dapat meningkatkan kadar c GMP pada kelinci hiperkolesterolemia.

VI.2. Saran

Berdasarkan penelitian diatas disarankan untuk :

- a. Melakukan penelitian lanjutan dengan perlakuan yang sama, dengan mengukur kadar nitik oksid dan sirkulasi sel endothelium.
- b. Menggali lebih dalam potensi curcumine untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat kardiovaskuler

DAFTAR PUSTAKA

- Boger RH and Frolich JC. 1997.** Dietary L-arginine reduce the progression of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits: Comparison with lovastatin. *Circulation*. 96:1282-1290.
- Brouet I and Ohshima H. 1995.** Curcumin, an anti tumour promoter and anti inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:533-540.
- Cohly HM., Taylor A and Salahuddin AK. 1998.** Effect of tumeric, turmerin and curcumin on H₂O₂ induced renal epithelial cell injury. *Free. Radic. Biol. Med.* 24: 49-54.
- Cooke JP., Singer AH and Tsao P. 1992.** Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J clin Invest.* 90: 1168-1172.
- Drexler H. 1996.** Endothelial function in heart failure. Some Unsolved Issues *European Heart Journal.* 17: 1775-1777.
- Evan CR and Brueddorfer. 1992.** Free radical, lipoprotein and cardiovascular dysfunction. *Am J. Hypertension.* 8: 28-41
- Flavahan NA. 1992.** Atherosclerosis of lipoprotein-induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF nitric oxide activity. *Circulation.* 85: 1927-1938.
- Flavahan NA., Shimokawa H and Vanhoute PM. 1991.** Inhibition of endothelium-dependent relaxations by phorbol myristate acetate in canine coronary arteries: role of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991. 256:50-55.
- Furchgott and Zawadzki JV. 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 375-376
- Hadi S. 1985.** Manfaat temu lawak ditinjau dari segi kedokteran. *Proceedings simposium nasional temu lawak.* UNPAD. Bandung.
- Hiadovec J and Prerovsky I. 1981.** Effect of hydroxyethylrutin on circulating endothelial cell in experimental animal and man. *Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series.* 42
- Inoue N and Nishida K. 1998.** Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits *Am.J.Med.Sci.* 242-247.
- Inoue N., Hirata K and Yamada M. 1992.** Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 71: 1410-1423.

- Karaki H and Sudjarwo SA. 1993.** Induction of endothelium dependent relaxation in the rat aorta by IRL 1620, a novel and selective agonist at the endothelin ETB receptor. *Br. J. Pharmacol.* 109: 371-374.
- Kaul S and Krishnakantha TP., 1997.** Influence of retinol deficiency and curcumin feeding on tissue microsomal membrane lipid peroxidation and fatty acids in rat. *Mol. Cell. Biochem.* 175: 43-48.
- Luster TF and Tanner FC. 1993.** Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertension.* 6: 283-293
- Mahfouz MM., Kawano H and Kummerow FA. 1997.** Effect of cholesterol rich diets with and without added vitamin E and C on the severity of the atherosclerosis in rabbits. *Am.J.Clin.Nutr.* 1240-1249.
- Matsuda Y., Hirata KI and Inoue N. 1993.** High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res.* 72: 1103-1109.
- Mei B and Chen WZ. 1994.** Protective effects of ginsenosides on oxygen free radical induce damages. *Yao.Hsueh.Pao* 29:801-808.
- Meredith IT, Yeung AC and Weidinger FF. 1993.** Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestation of coronary artery disease. *Circulation.* 87: 56-66.
- Miller E. 1990.** HDL metabolism and its role lipid transport. *Eur Heart J.* 11: 1-3.
- Miwa Y., Hirata K and Matsuda Y. 1993.** Lysophosphatidylcholine inhibits agonist-induced calcium mobilization in endothelial cells of isolated rabbits aorta. *Circulation.* 88: 1621.
- Ohara Y., Peterson TE and Harrison DG. 1992.** Hypercholesterolemia increases superoxide anion. *Circulation.* 86: 1222.
- Osawa T., Sugiyama Y and Kawakishi S. 1995.** Antioxidative activity of Curcumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1609-1612.
- Pierdomenico SD., Costantino F and Mezetti A. 1998.** LDL oxidation and Vitamin E and C in sustained and white coat hypertension. *Hypertension.* 31: 621-626.
- Piyachaturawat P and Suksamrarn A. 1997.** Hypolipidemic effect of curcuma comosa in mice. *Artery.* 22: 233-241.
- Priyadarshni KT. 1997.** Free radical reactions of curcumin in membrane model. *Free. Radic. Biol. Med.* 23: 838-843.
- Rajakumar DV and Rao MN. 1994.** Antioxidant properties of dehydrozingerone and curcumin in rat brain homogenates. *Mol.Cell.Biochem.* 140: 73-79

- Shimokawa H., Flavahan NA and Vanhoutte PM. 1990.** Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations in regenerating porcine endothelial cells. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Circ Res* 65: 740-753.
- Simon BC., Haudenschild CC and Cohen RA. 1993.** Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 21: 893-901.
- Sosmen B., Kazaz L and Tuzun S. 1998.** Effect of N dicycloprorylmethyl-amino-2-oxazoline on antioxidan status and nitric oxide in hypertensive patients. *Current Med Res and opinion.* 14:89-96
- Srejayan and Rao MN.1994.** Curcuminoid as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 1013-1016.
- Sudjarwo SA., Hori M., Tanaka T., Matsuda Y and Karaki H, 1996.** Coupling of the endothelin ETA and ETB receptors to Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in vascular smooth muscle. *European.J.Pharmac.* 289: 197-204
- Sudjarwo SA., Hori M and Karaki H. 1992.** Effect of endothelin-3 on cytosolic calcium level in vascular endothelium and on smooth muscle contraction. *Eur.J. Pharmacol.* 229. 137
- Sudjarwo SA 1997.** Pengaruh pemberian ekstrak temu lawak (*Curcuma xanthomica roxb*) terhadap kadar LDL, HDL dan total kolesterol pada tikus hiperkholesterolemia.
- Stecher PG. 1968.** The merck index: an encyclopedia of chemicals and drugs. Merck & Co. Inc. USA. 305
- Steinberg and Witztum JL. 1990.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart J.* 69: 512-518.
- Suryohudoyo P. 1997.** Oksidan dan antioksidan pada diabetes melitus *Diabetes Update* III. Surabaya. Nov: 27-39
- Wijaya A. 1998.** Disfungsi endothel, atherosklerosis dan trombosis *Forum Diagnosticum. Prodia Diagnostic Educational Service.* 1-24.

Lampiran 1. Kadar MDA dari berbagai Kelompok.

Ulangan	Kadar MDA ($\mu\text{M/ml}$)			
	Kontrol +	Kontrol -	Curcumin 20 mg	Curcumin 20 mg
1	6.8	3.3	5.6	3.9
2	5.9	2.8	4.1	2.7
3	6.6	3.2	4.7	2.9
4	6.2	2.9	3.8	3.4
5	7.1	3.3	2.9	3.1
6	7.3	2.6	3.3	2.5

Lampiran 2. Analisis Statistik Kadar MDA dari berbagai Kelompok

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	52.005	3	17.335	43.858	.000
Within Groups	7.905	20	.395		
Total	59.910	23			

LSD

(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol positif	Kontrol negatif	3.6333*	.3630	.000	2.8762	4.3905
	Dosis 20 mg	2.5833*	.3630	.000	1.8262	3.3405
	Dosis 40 mg	3.5667*	.3630	.000	2.8095	4.3238
Kontrol negatif	Kontrol positif	-3.6333*	.3630	.000	-4.3905	-2.8762
	Dosis 20 mg	-1.0500*	.3630	.009	-1.8072	-.2928
	Dosis 40 mg	-6.6667E-02	.3630	.856	-.8238	.6905
Dosis 20 mg	Kontrol positif	-2.5833*	.3630	.000	-3.3405	-1.8262
	Kontrol negatif	1.0500*	.3630	.009	.2928	1.8072
	Dosis 40 mg	.9833*	.3630	.014	.2262	1.7405
Dosis 40 mg	Kontrol positif	-3.5667*	.3630	.000	-4.3238	-2.8095
	Kontrol negatif	6.6667E-02	.3630	.856	-.6905	.8238
	Dosis 20 mg	-.9833*	.3630	.014	-1.7405	-.2262

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3. Data relaksasi asetilkolin pada aorta kelinci dari berbagai kelompok

No	Relaksasi dari Asetilkolin (%) pada :											
	Kontrol positif			Kontrol negatif			Curcumine 20 mg/kg BB			Curcumine 40 mg/kg BB		
	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm
1	0	35.1	54.5	5	51.6	77.6	20	69.2	75	25	51.6	77.7
2	0	46.2	61.5	22.2	60.6	78.9	22.4	55.6	71.4	22.2	60.6	78.9
3	0	41.6	55.6	22	71.6	73.3	11.8	56.7	68.2	22	71.6	73.3
4	0	41.2	60	20.8	67.7	60	21.9	50	75	20.8	67.7	60
5	0	42.1	58.9	24.2	64.9	74.5	22.1	59.9	74.2	24.5	64.9	70.5
6	0	40.1	56.9	20.2	60.9	70.5	16.1	55.9	70.2	22.5	60.0	74.5

Lampiran 4. Analisis Statistisk Relaksasi Asetilkolin dari berbagai Kelompok

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41378.023	11	3761.638	159.967	.000
Within Groups	1410.903	60	23.515		
Total	42788.926	71			

LSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KP 1	KP 2	-41.0500*	2.7997	.000	-46.6502	-35.4498
	KP 3	-57.9000*	2.7997	.000	-63.5002	-52.2998
	KN 1	-22.4000*	2.7997	.000	-28.0002	-16.7998
	KN 2	-62.8833*	2.7997	.000	-68.4836	-57.2831
	KN 3	-72.4667*	2.7997	.000	-78.0669	-66.8664
	C1D1	-19.0500*	2.7997	.000	-24.6502	-13.4498
	C1D2	-57.8833*	2.7997	.000	-63.4836	-52.2831
	C1D3	-72.3333*	2.7997	.000	-77.9336	-66.7331
	C2D1	-22.8333*	2.7997	.000	-28.4336	-17.2331
	C2D2	-62.8833*	2.7997	.000	-68.4836	-57.2831
C2D3	-72.4833*	2.7997	.000	-78.0836	-66.8831	
KP 2	KP 1	41.0500*	2.7997	.000	35.4498	46.6502
	KP 3	-16.8500*	2.7997	.000	-22.4502	-11.2498
	KN 1	18.6500*	2.7997	.000	13.0498	24.2502
	KN 2	-21.8333*	2.7997	.000	-27.4336	-16.2331
	KN 3	-31.4167*	2.7997	.000	-37.0169	-25.8164
	C1D1	22.0000*	2.7997	.000	16.3998	27.6002

	C1D2	-16.8333*	2.7997	.000	-22.4336	-11.2331
	C1D3	-31.2833*	2.7997	.000	-36.8836	-25.6831
	C2D1	18.2167*	2.7997	.000	12.6164	23.8169
	C2D2	-21.8333*	2.7997	.000	-27.4336	-16.2331
	C2D3	-31.4333*	2.7997	.000	-37.0336	-25.8331
KP 3	KP 1	57.9000*	2.7997	.000	52.2998	63.5002
	KP 2	16.8500*	2.7997	.000	11.2498	22.4502
	KN 1	35.5000*	2.7997	.000	29.8998	41.1002
	KN 2	-4.9833*	2.7997	.080	-10.5836	.6169
	KN 3	-14.5667*	2.7997	.000	-20.1669	-8.9664
	C1D1	38.8500*	2.7997	.000	33.2498	44.4502
	C1D2	1.667E-02	2.7997	.995	-5.5836	5.6169
	C1D3	-14.4333*	2.7997	.000	-20.0336	-8.8331
	C2D1	35.0667*	2.7997	.000	29.4664	40.6669
	C2D2	-4.9833	2.7997	.080	-10.5836	.6169
KN 1	KP 1	22.4000*	2.7997	.000	16.7998	28.0002
	KP 2	-18.6500*	2.7997	.000	-24.2502	-13.0498
	KP 3	-35.5000*	2.7997	.000	-41.1002	-29.8998
	KN 2	-40.4833*	2.7997	.000	-46.0836	-34.8831
	KN 3	-50.0667*	2.7997	.000	-55.6669	-44.4664
	C1D1	3.3500	2.7997	.236	-2.2502	8.9502
	C1D2	-35.4833*	2.7997	.000	-41.0836	-29.8831
	C1D3	-49.9333*	2.7997	.000	-55.5336	-44.3331
	C2D1	-.4333	2.7997	.878	-6.0336	5.1669
	C2D2	-40.4833*	2.7997	.000	-46.0836	-34.8831
C2D3	-50.0833*	2.7997	.000	-55.6836	-44.4831	
KN 2	KP 1	62.8833*	2.7997	.000	57.2831	68.4836
	KP 2	21.8333*	2.7997	.000	16.2331	27.4336
	KP 3	4.9833	2.7997	.080	-.6169	10.5836
	KN 1	40.4833*	2.7997	.000	34.8831	46.0836
	KN 3	-9.5833*	2.7997	.001	-15.1836	-3.9831
	C1D1	43.8333*	2.7997	.000	38.2331	49.4336
	C1D2	5.0000	2.7997	.079	-.6002	10.6002
	C1D3	-9.4500*	2.7997	.001	-15.0502	-3.8498
	C2D1	40.0600*	2.7997	.000	34.4498	45.6502
	C2D2	.0000	2.7997	1.000	-5.6002	5.6002
C2D3	-9.6000*	2.7997	.001	-15.2002	-3.9998	
KN 3	KP 1	72.4667*	2.7997	.000	66.8664	78.0669
	KP 2	31.4167*	2.7997	.000	25.8164	37.0169
	KP 3	14.5667*	2.7997	.000	8.9664	20.1669
	KN 1	50.0667*	2.7997	.000	44.4664	55.6669
	KN 2	9.5833*	2.7997	.001	3.9831	15.1836
	C1D1	53.4167*	2.7997	.000	47.8164	59.0169
	C1D2	14.5833*	2.7997	.000	8.9831	20.1836
	C1D3	.1333	2.7997	.962	-5.4669	5.7336
	C2D1	49.6333*	2.7997	.000	44.0331	55.2336
	C2D2	9.5833*	2.7997	.001	3.9831	15.1836
C2D3	-1.6667E-02	2.7997	.995	-5.6169	5.5836	
C1D1	KP 1	19.0500*	2.7997	.000	13.4498	24.6502
	KP 2	-22.0000*	2.7997	.000	-27.6002	-16.3998
	KP 3	-38.8500*	2.7997	.000	-44.4502	-33.2498
	KN 1	-3.3500	2.7997	.236	-8.9502	2.2502
	KN 2	-43.8333*	2.7997	.000	-49.4336	-38.2331
	KN 3	-53.4167*	2.7997	.000	-59.0169	-47.8164
	C1D2	-38.8333*	2.7997	.000	-44.4336	-33.2331
	C1D3	-53.2833*	2.7997	.000	-58.8836	-47.6831
	C2D1	-3.7833	2.7997	.182	-9.3836	1.8169
	C2D2	-43.8333*	2.7997	.000	-49.4336	-38.2331
C2D3	-53.4333*	2.7997	.000	-59.0336	-47.8331	
C1D2	KP 1	57.8833*	2.7997	.000	52.2831	63.4836
	KP 2	16.8333*	2.7997	.000	11.2331	22.4336

	KP 3	-1.6667E-02	2.7997	995	-5.6169	5.5836
	KN 1	35.4833*	2.7997	.000	29.8831	41.0836
	KN 2	-5.0000	2.7997	.079	-10.6002	.6002
	KN 3	-14.5833*	2.7997	.000	-20.1836	-8.9831
	C1D1	38.8333*	2.7997	.000	33.2331	44.4336
	C1D3	-14.4500*	2.7997	.000	-20.0502	-8.8498
	C2D1	35.0500*	2.7997	.000	29.4498	40.6502
	C2D2	-5.0000	2.7997	.079	-10.6002	.6002
	C2D3	-14.6000*	2.7997	.000	-20.2002	-8.9998
C1D3	KP 1	72.3333*	2.7997	.000	66.7331	77.9336
	KP 2	31.2833*	2.7997	.000	25.6831	36.8836
	KP 3	14.4333*	2.7997	.000	8.8331	20.0336
	KN 1	49.9333*	2.7997	.000	44.3331	55.5336
	KN 2	9.4500*	2.7997	.001	3.8498	15.0502
	KN 3	-.1333	2.7997	.962	-5.7336	5.4669
	C1D1	53.2833*	2.7997	.000	47.6831	58.8836
	C1D2	14.4500*	2.7997	.000	8.8498	20.0502
	C2D1	49.5000*	2.7997	.000	43.8998	55.1002
	C2D2	9.4500*	2.7997	.001	3.8498	15.0502
	C2D3	-.1500	2.7997	.957	-5.7502	5.4502
C2D1	KP 1	22.8333*	2.7997	.000	17.2331	28.4336
	KP 2	-18.2167*	2.7997	.000	-23.8169	-12.6164
	KP 3	-35.0667*	2.7997	.000	-40.6669	-29.4664
	KN 1	.4333	2.7997	.878	-5.1669	6.0336
	KN 2	-40.0500*	2.7997	.000	-45.6502	-34.4498
	KN 3	-49.6333*	2.7997	.000	-55.2336	-44.0331
	C1D1	3.7833	2.7997	.182	-1.8169	9.3836
	C1D2	-35.0500*	2.7997	.000	-40.6502	-29.4498
	C1D3	-49.5000*	2.7997	.000	-55.1002	-43.8998
	C2D2	-40.0500*	2.7997	.000	-45.6502	-34.4498
	C2D3	-49.6500*	2.7997	.000	-55.2502	-44.0498
C2D2	KP 1	62.8833*	2.7997	.000	57.2831	68.4836
	KP 2	21.8333*	2.7997	.000	16.2331	27.4336
	KP 3	4.9833	2.7997	.080	-.6169	10.5836
	KN 1	40.4833*	2.7997	.000	34.8831	46.0836
	KN 2	.0000	2.7997	1.000	-5.6002	5.6002
	KN 3	-9.5833*	2.7997	.001	-15.1836	-3.9831
	C1D1	43.8333*	2.7997	.000	38.2331	49.4336
	C1D2	5.0000	2.7997	.079	-.6002	10.6002
	C1D3	-9.4500*	2.7997	.001	-15.0502	-3.8498
	C2D1	40.0500*	2.7997	.000	34.4498	45.6502
	C2D3	-9.6000*	2.7997	.001	-15.2002	-3.9998
C2D3	KP 1	72.4833*	2.7997	.000	66.8831	78.0836
	KP 2	31.4333*	2.7997	.000	25.8331	37.0336
	KP 3	14.5833*	2.7997	.000	8.9831	20.1836
	KN 1	50.0833*	2.7997	.000	44.4831	55.6836
	KN 2	9.6000*	2.7997	.001	3.9998	15.2002
	KN 3	1.667E-02	2.7997	.995	-5.5836	5.6169
	C1D1	53.4333*	2.7997	.000	47.8331	59.0336
	C1D2	14.6000*	2.7997	.000	8.9998	20.2002
	C1D3	.1500	2.7997	.957	-5.4502	5.7502
	C2D1	49.6500*	2.7997	.000	44.0498	55.2502
	C2D2	9.6000*	2.7997	.001	3.9998	15.2002

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 5. Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok

Ulangan	Kadar c GMP (f mol/ μ l)			
	Kontrol +	Kontrol -	Curcumin 20 mg	Curcumin 20 mg
1	13	24	18	23
2	14	25	17	24
3	13	25	16	23
4	14	23	17	24
5	13	24	18	23
6	14	25	18	24

Lampiran 6. Analisis Statistik Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	479.667	3	159.889	330.805	.000
Within Groups	9.667	20	.483		
Total	489.333	23			

LSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatip	Kontrol positip	10.8333*	.4014	.000	9.9961	11.6706
	Dosis 20 mg	7.0000*	.4014	.000	6.1627	7.8373
	Dosis 40 mg	.8333	.4014	.051	-3.9442E-03	1.6706
Kon positip	Kontrol negatip	-10.8333*	.4014	.000	-11.6706	-9.9961
	Dosis 20 mg	-3.8333*	.4014	.000	-4.6706	-2.9961
	Dosis 40 mg	-10.0000*	.4014	.000	-10.8373	-9.1627
Dosis 20 mg	Kontrol negatip	-7.0000*	.4014	.000	-7.8373	-6.1627
	Kontrol positip	3.8333*	.4014	.000	2.9961	4.6706
	Dosis 40 mg	-6.1667*	.4014	.000	-7.0039	-5.3294
Dosis 40 mg	Kontrol negatip	-.8333	.4014	.051	-1.6706	3.944E-03
	Kontrol positip	10.0000*	.4014	.000	9.1627	10.8373
	Dosis 20 mg	6.1667*	.4014	.000	5.3294	7.0039

* The mean difference is significant at the .05 level.