

Modifikasi Protein Akibat Pembebanan Glukosa dengan Model Reaksi Glikosilasi Nonenzimatik *in vitro*

Protein Modification of Glucose Effect of Encumbering with the Model React the Glikosilasi Nonenzimatik in vitro

**Eko Suhartono¹, Bambang Setiawan¹, Mashur²,
Maya Juniarti³-, Insanul Kamilah³-, Haudhiya³-**

¹Bagian Kimia Kedokteran-Kelompok Studi Radikal Bebas Pemanfaatan Bahan Alam Fakultas Kedokteran,²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran ³Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan

Korespondensi: Drs. Eko Suhartono, M.Si; Bagian Kimia Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Jl. A. Yani Km.36 Banjarbaru
Kalimantan Selatan Telp (0511) 4773470 Hp.08155047910
e-mail: ekoantioksidan@yahoo.com

Abstract

Glycosylation reaction causes protein modification. Glycosylation is a reaction between aldehyde group from reducing sugar with amine group of protein. The aim of this study was to measure Advanced Glycation End Products (AGEs) formation, dicarbonyl compound and tyrosine degradation in glycosylation reaction in vitro.

A quasi experimental study was done to four treated groups, i.e. P1= 5 ml Bovine Serum Albumin (BSA), 10 ml phosphate buffer dan 10 ml aquadest; P2= 5 ml BSA, 10 ml phosphate buffer and 10 ml glucose 125 mM; P3= 5 ml BSA, 10 ml phosphate buffer and 10 ml glucose 250 mM; P4= 5 ml BSA, 10 ml phosphate buffer and 10 ml glucose 500 mM. AGEs compound was measured for 21 days using spectrophotometer at $\lambda = 390$ nm. Dicarbonyl compound was measured by DNPH odification methods at $\lambda = 470$ nm. Tyrosine degradation was measured using Millon-Nasse reaction.

Anova and Tuckey HSD test concluded there are significant difference between each groups ($P < 0,05$). Based on correlation regresion test conclude that the increase of dicarbonyl compounds, AGEs and tyrosine degradation had positive correlation with increase of glucose concentration. Glucose overloading could induce protein modification in vitro.

Keywords : AGEs, dicarbonyl compound, glucose, Glycosylation reaction, tyrosine.

Abstrak

Salah satu penyebab modifikasi protein adalah reaksi glikosilasi. Reaksi glikosilasi adalah reaksi antara gugus aldehid gula pereduksi dengan gugus amina protein. Penelitian ini bertujuan mengukur *Advanced Glycation End Products* (AGEs), senyawa dikarbonil maupun degradasi tirosin pada reaksi glikosilasi *in vitro*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental semu dengan *pre and post control group design* terhadap empat kelompok perlakuan, yaitu P1= 5 ml *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 ml buffer fosfat dan 10 ml aquadest; P2= 5 ml BSA, 10 ml buffer fosfat dan 10 ml glukosa 125 mM; P3= 5 ml BSA, 10 ml buffer fosfat dan 10 ml glukosa 250 mM; P4= 5 ml BSA, 10 ml buffer fosfat dan 10 ml glukosa 500 mM. Absorbansi senyawa AGEs diukur selama 21 hari pada $\lambda = 340$ nm sedangkan absorbansi senyawa dikarbonil diukur dengan $\lambda = 390$ nm dan absorbansi degradasi

tirosin dengan $\lambda = 470$ nm. Pengukuran absorbansi senyawa dikarbonil menggunakan metoda DNPH yang dimodifikasi, sedangkan pengukuran degradasi tirosin menggunakan reaksi Millon-Nasse.

Berdasarkan hasil uji Anova dan Beda Nyata Jujur, disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) tiap kelompok perlakuan. Berdasarkan uji korelasi regresi dapat disimpulkan bahwa pembentukan senyawa dikarbonil, AGEs dan degradasi tirosin berkorelasi positif dengan peningkatan konsentrasi glukosa. Pembebanan glukosa yang berlebih dapat memicu modifikasi protein *in vitro*.

Kata Kunci : AGEs, dikarbonil, glukosa, reaksi glikosilasi, tirosin.

Pendahuluan

Modifikasi protein adalah protein yang strukturnya mengalami perubahan, yang secara umum ditandai oleh pembentukan senyawa dikarbonil, ikatan silang, fluoresensi, dan lain-lain.¹ Modifikasi ini diduga merupakan jalur antara, yang dapat mendasari berbagai patofisiologis penyakit, misalnya penuaan dini, kepikunan, aterosklerosis, dan lain-lain. Salah satu penyebab modifikasi protein tersebut adalah pembebanan glukosa melalui reaksi glikosilasi.²

Reaksi glikosilasi atau reaksi Maillard adalah reaksi antara gugus amina protein dengan gugus aldehyd dari glukosa yang dapat membentuk produk-produk reaktif, yang selanjutnya dapat memodifikasi protein. Reaksi ini dicirikan dengan terjadinya pencokelatan nonenzimatik antara gula pereduksi dan asam amino bebas yang reaktif dari protein.^{2,3}

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa, pemberian glukosa 200 mg/L pada protein menyebabkan reaksi glikosilasi dan terbentuk senyawa dikarbonil 7,5 kali dibandingkan dengan kontrol.^{4,5,6} Pada penelitian sebelumnya juga dinyatakan bahwa waktu inkubasi pada reaksi glikosilasi, akan dapat menyebabkan peningkatan pembentukan senyawa dikarbonil dan *Advance Glycation End Products* (AGEs) secara bermakna. Selain itu, juga dihasilkan penurunan kadar tirosin.^{1,2,3}

Pada penelitian lain disebutkan bahwa, reaksi glikosilasi dapat dihambat oleh gliclazide, yang ditandai oleh penurunan kadar senyawa dikarbonil.^{4,5,6} Selain itu, hasil penelitian lain juga disimpulkan bahwa reaksi glikosilasi dapat

dihambat oleh tanaman obat, antara lain daun dewa, belimbing wuluh, dan mengkudu.^{7,8,9}

Di bidang kedokteran, reaksi glikosilasi diduga turut mendasari komplikasi pada diabetes melitus. Pada diabetes melitus, reaksi diawali dengan keadaan hiperglikemia, yang selanjutnya akan meningkatkan pembentukan basa Schiff antara gugus aldehyd glukosa dengan residu lisin, arginin, dan histidin. Reaksi yang bekerja secara nonenzimatik tersebut, setelah 24-48 jam, akan menyebabkan penataan ulang pada basa Schiff menjadi bentuk yang lebih stabil. Produk yang lebih stabil itu disebut produk Amadori dan melalui serangkaian reaksi lanjutan akan membentuk AGEs.¹⁰

Beberapa penelitian yang berkaitan dengan reaksi glikosilasi *in vivo* banyak dilakukan, terutama tentang efek yang ditimbulkannya. Penelitian yang dilakukan oleh Matsuoka¹¹ dan Oldfield¹² mengungkapkan bahwa pada model binatang diabetes, pembentukan AGEs dapat mengganggu berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru, dan saraf. Penelitian Ueno¹³ juga menyebutkan bahwa akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas. Akumulasi AGEs tersebut dapat menyebabkan peningkatan stress oksidatif, yang selanjutnya berperan dalam patogenesis komplikasi diabetes dan penuaan dini.^{14,15} Pengikatan AGEs terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan serta peningkatan stress oksidatif.¹⁶

Di Indonesia, penelitian tentang modifikasi protein yang diakibatkan oleh

reaksi glikosilasi, masih jarang dilakukan. Bertitik tolak dari hal tersebut, maka penelitian ini mempelajari pengaruh kadar glukosa terhadap modifikasi protein. Selain itu, juga akan dipelajari korelasi kadar glukosa terhadap protein yang termodifikasi. Protein yang termodifikasi akibat reaksi glikosilasi dapat diukur sebagai kadar senyawa dikarbonil, pembentukan AGEs, dan kadar asam amino protein. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap lebih banyak tentang dasar dan mekanisme patogenesis penyakit yang melibatkan model reaksi glikosilasi.

Bahan dan Cara

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru pada bulan Januari-April 2005. Bahan kimia yang digunakan meliputi glukosa, buffer fosfat pH 7,4, BSA 30%, aquadest, NaOH, etanol 70% dan 10%, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), HCl 2,5 M, asam trikloroasetat (TCA) 20 % dan 10%, asam asetat 10 %, urea 9 M, serta NaOH 0,4 N, Fe-EDTA, H₂O₂ 10 mmol/ltr, dan etanol-etil asetat. Keseluruhan bahan kimia yang digunakan merupakan bahan pure analis (p.a)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat gelas (Pyrex®), pH meter (Cyberscan®), sentrifuge (Centurion®), stopwatch (Hanhart®), vortex (VM-300®), inkubator (Heto®), neraca analitik (Gibertini® e425-b), mikropipet (Transferpette®), dan spektrofotometer (Biosystems® BTS-305).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan

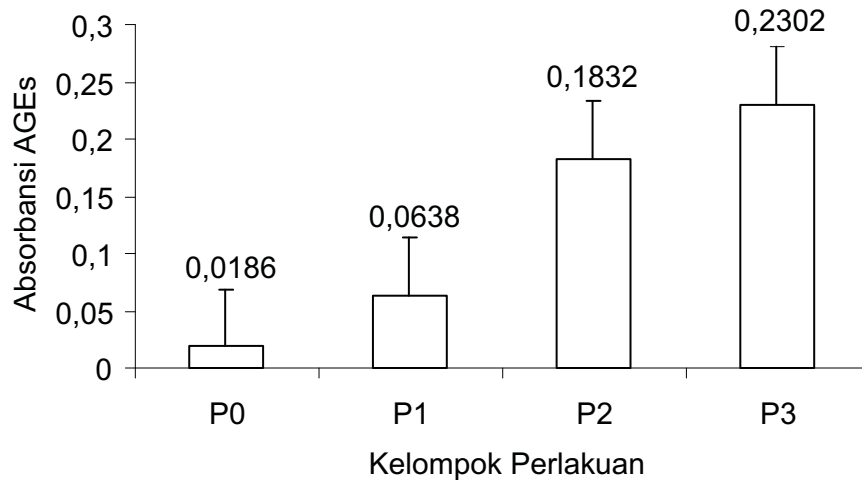
rancangan *pre and post control of design*. Penelitian ini dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, yang terdiri atas: P0 (kontrol) adalah campuran antara 5 mL Bovine Serum Albumin (BSA), 10 ml buffer fosfat, dan 10 ml aquadest; P1 adalah campuran antara 5 mL Bovine Serum Albumin (BSA), 10 ml buffer fosfat, dan 10 ml glukosa 125 mM; P2 adalah campuran antara 5 mL Bovine Serum Albumin (BSA), 10 ml buffer fosfat, dan 10 ml glukosa 250 mM; P3 adalah campuran antara 5 mL Bovine Serum Albumin (BSA), 10 ml buffer fosfat, dan 10 ml glukosa 500 mM.

Masing-masing kelompok diinkubasi selama 3 minggu pada suhu 37°C di dalam inkubator. Pengukuran absorbansi senyawa AGEs dengan metode yang dikembangkan oleh Valencia.¹⁷ Absorbansi senyawa dikarbonil ditentukan oleh metoda yang dikembangkan oleh Uchida¹⁸ dan dimodifikasi Sadikin¹⁹, sedangkan absorbansi tirosin diukur dengan menggunakan reaksi Millon-Nasse.

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji ANOVA dilanjutkan dengan uji Tuckey HSD dengan $\alpha=0,05$. Sementara itu, untuk mengetahui korelasi antara konsentrasi glukosa dengan AGEs, senyawa dikarbonil, dan tirosin digunakan uji korelasi regresi linier. Pengujian dilakukan dengan bantuan program SPSS for windows.

Hasil

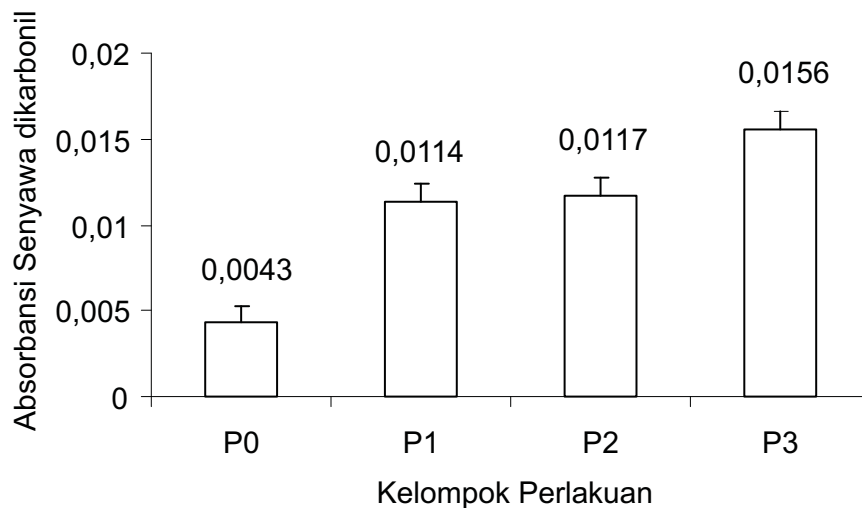
Pada penelitian ini, reaksi glikosilasi berlangsung selama 20 hari. Berdasarkan hasil pengukuran terlihat bahwa pembentukan AGEs dan senyawa karbonil cenderung meningkat dengan semakin tingginya konsentrasi glukosa.



Gambar 1. Absorbansi AGEs pada berbagai kelompok perlakuan

Berdasarkan uji ANOVA disimpulkan bahwa absorbansi AGEs pada berbagai kelompok perlakuan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hasil perhitungan uji Tuckey HSD disimpulkan bahwa P0 berbeda bermakna dengan P1, P2, dan P3 ($p < 0,05$).

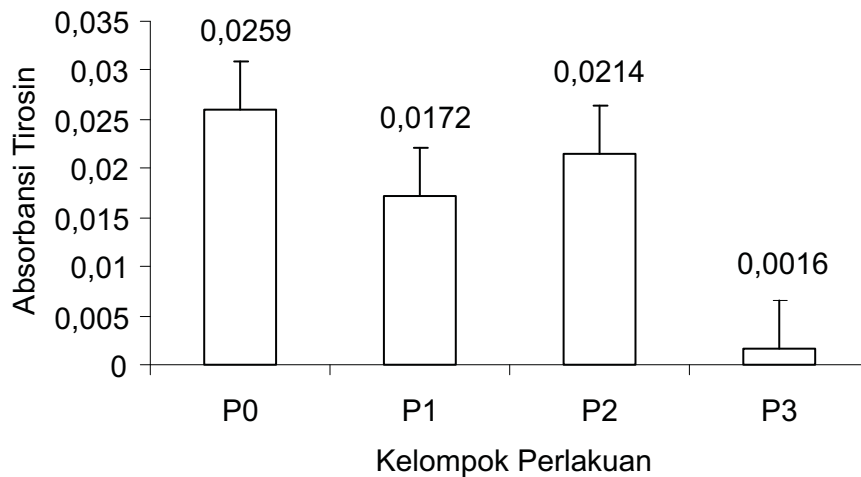
Sementara itu, P1 berbeda bermakna dengan P2 dan P3 ($p < 0,05$). Disamping itu, P2 tidak berbeda bermakna dengan P3 ($p > 0,05$). Korelasi konsentrasi glukosa dengan absorbansi AGEs diperoleh $r = 0,9511$ ($p < 0,05$).



Gambar 2. Absorbansi senyawa dikarbonil pada berbagai kelompok perlakuan

Berdasarkan uji ANOVA disimpulkan bahwa absorbansi senyawa dikarbonil pada berbagai kelompok perlakuan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hasil perhitungan uji Tuckey HSD disimpulkan bahwa P0 berbeda bermakna dengan P2, dan P3 ($p < 0,05$). Sementara itu, P1 tidak

berbeda bermakna dengan P0, P2 dan P3 ($p > 0,05$). Disamping itu, P2 tidak berbeda bermakna dengan P3 ($p > 0,05$). Korelasi konsentrasi glukosa dengan absorbansi senyawa dikarbonil diperoleh $r = 0,9103$ ($p < 0,05$).



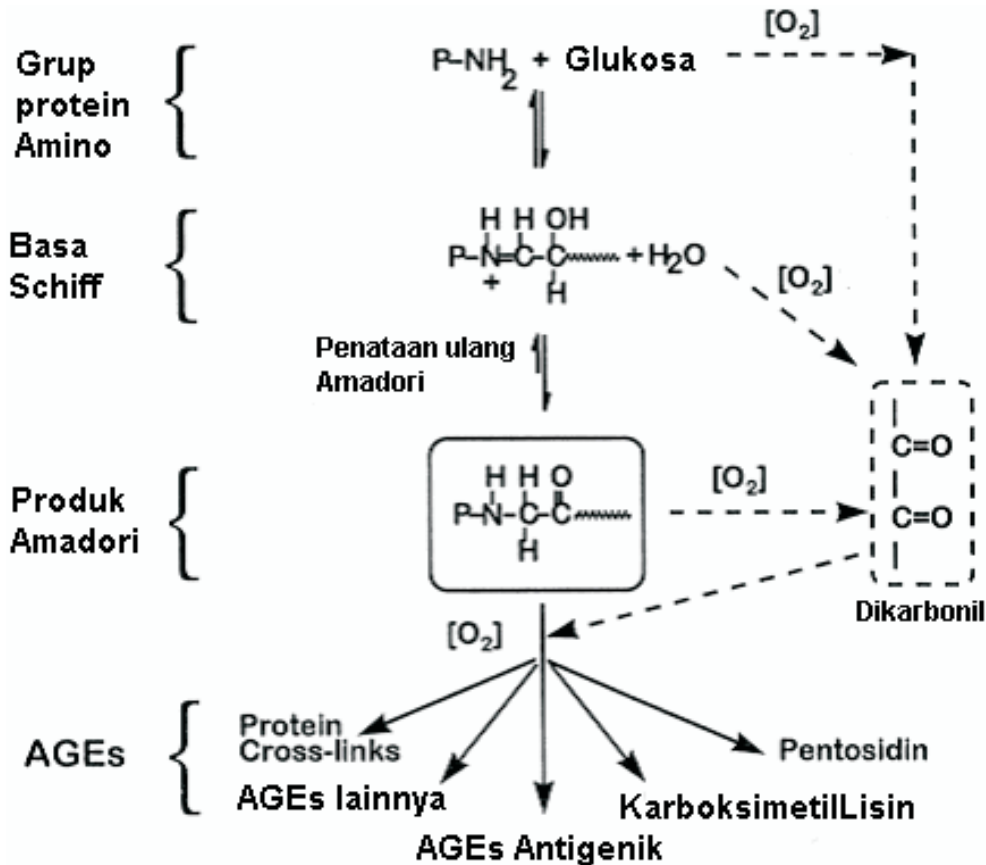
Gambar 3. Absorbansi tirosin pada berbagai kelompok perlakuan

Berdasarkan uji ANOVA disimpulkan bahwa absorbansi tirosin pada berbagai kelompok perlakuan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hasil perhitungan uji Tuckey HSD disimpulkan bahwa P0 berbeda bermakna dengan P2, dan P3 ($p < 0,05$). Sementara itu, P1 tidak berbeda bermakna dengan P0 ($p > 0,05$), tetapi berbeda dengan P2 dan P3 ($p < 0,05$). Disamping itu, P2 tidak berbeda bermakna dengan P3 ($p > 0,05$). Korelasi konsentrasi glukosa dengan absorbansi tirosin diperoleh $r = -0,9103$ ($p < 0,05$)

Diskusi

Pada penelitian ini, peningkatan konsentrasi glukosa juga akan meningkatkan modifikasi protein, yang ditandai oleh pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil secara bermakna. Hal

ini disebabkan oleh glukosa merupakan monosakarida yang memiliki gugus karbonil dan memiliki kestabilan struktur dalam bentuk hemiasetal siklik. Akan tetapi, apabila molekul ini dilarutkan dalam air, maka struktur molekul ini akan berubah menjadi struktur rantai lurus. Ketika berstruktur rantai lurus, gugus karbonil yang dimiliki oleh glukosa akan bersifat reaktif, yakni sebagai pereduksi.²⁰ Sifat pereduksi ini, memungkinkan gugus karbonil yang dimiliki glukosa akan bereaksi dengan gugus amina yang dimiliki oleh protein. Reaksi berkelanjutan antara gugus karbonil glukosa dengan gugus amina protein ini disebut reaksi glikosilasi. Mekanisme reaksi glikosilasi sehingga menghasilkan AGEs dan senyawa dikarbonil dijelaskan pada Gambar 4.



Gambar 4. Mekanisme pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil

Mekanisme pembentukan AGEs bersifat sangat kompleks dan rumit, akan tetapi dapat dibagi dalam 3 tahap. Tahap pertama reaksi terjadi lewat transformasi D-glukopiroson, yakni perubahan struktur hemiasetal siklik dari molekul glukosa menjadi molekul yang linear dengan gugus aldehyd (CHO) pada salah satu sisinya, reaksi ini disebut *browning*. Gugus aldehyd pada rantai lurus glukosa tersebut kemudian bereaksi dengan gugus amino ($-NH_2$) protein. Hasil reaksi awal dikenal sebagai *basa schiff*, yang secara spontan mengalami penataan ulang menjadi produk Amadori. Penataan ulang produk Amadori menghasilkan senyawa dikarbonil.²¹

Tahap kedua terjadi sesudah berlangsung beberapa hari, yakni terjadinya serangkaian perubahan melalui proses jalur oksidatif, nonoksidatif, maupun penataan ulang. Pada jalur oksidatif terbentuk senyawa N-karboksimetilisin (CML) dan

pentosidin. Pada jalur jalur non-oksidatif dihasilkan senyawa pirlin dan proses penataan ulang akan dihasilkan 3-deoksiglukoson (3-DG). Selanjutnya, tahap ketiga akan menghasilkan senyawa yang sangat tidak stabil dan reaktif. Senyawa antara yang terbentuk pada tahap kedua akan bereaksi secara polimerisasi dengan struktur protein membentuk senyawa AGEs.²²

Pada penelitian ini, peningkatan konsentrasi glukosa menyebabkan penurunan absorbansi tirosin secara bermakna. Menurunnya kadar tirosin diduga disebabkan oleh beberapa mekanisme, antara lain pertama ialah mekanisme aminasi yang bersifat reduktif, yakni perubahan posisi gugus amina dari primer menjadi sekunder akibat adanya gugus karbonil pada glukosa. Perubahan ini terjadi melalui pembentukan produk antara hemiaminal. Kedua, mekanisme reaksi

Kolbe, yakni reaksi antara gugus fenolat yang dimiliki tirosin dengan gugus karbonil pada glukosa melalui efek tautomeri.²³

Hal menarik yang ditemui pada penelitian ini adalah pada absorbansi tirosin pada kelompok P1, P2, dan P3. Pada P1, pembebanan 125 mM glukosa menyebabkan penurunan absorbansi tirosin dibandingkan P0. Akan tetapi, pembebanan 250 mM glukosa (P2) menyebabkan peningkatan absorbansi tirosin dibandingkan P1. Kemudian pada pembebanan 500 mM glukosa (P3), absorbansi tirosin meningkat dibandingkan P2. Kejadian ini diduga disebabkan oleh efek tautomeri pada glukosa, yang mampu mengubah bentuk keton menjadi aldehid atau sebaliknya dalam model termodinamika yang jauh dari kesetimbangan.

Pada bentuk aldehid, glukosa akan reaktif tetapi pada bentuk keton, glukosa menjadi kurang aktif begitu seterusnya. Perubahan bentuk tersebut, akan menghasilkan pola keteraturan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi tirosin, yang disebut dengan osilasi. Pola tersebut disebabkan oleh pola pelepasan dan penangkapan ion H⁺ dari tirosin dan oleh glukosa begitu seterusnya. Kenyataan ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya, yakni model osilasi glukosa pada jalur glikolisis.²³ Pada model tersebut, ion H⁺ yang bersumber dari NADH mengalami pelepasan dan penangkapan kembali secara terus menerus. Pada model tersebut dihasilkan pola gelombang yang mirip dengan gelombang sinus.²³

Daftar Pustaka

1. Suhartono E., Setiawan B., Edyson, Mashuri. Modifikasi protein akibat reaksi Maillard dan pengaruhnya terhadap kadar tirosin. *Jurnal Profesi Medika*.2004;4(2):20-28.
2. Suhartono E., Rohman T., Setiawan B., Primasari AA. Model pembentukan Advance Glycation End Products dan modifikasi protein akibat reaksi glikosilasi. *Maj.Kedokt.Indon*. 2005;55(11):681-685.
3. Suhartono E., Setiawan B., Mashuri. Model pembentukan Advance Glycation End Products dan modifikasi degradasi tirosin akibat reaksi maillard. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 2005;13(1):50-55.
4. Damayanthi ED., Qamariah N., Suhartono, E., Penghambatan kerusakan protein oleh infus batang tanaman brotowali (*Tinospora crispa* L. Miers) akibat konsentrasi glukosa berlebih in vitro. *Berkala Kedokteran*. 2003; 3(1):27-32.
5. Budianto R., Qamariah N., Suhartono, E., Potensi infus daun pare (*Momordica charantia*) sebagai penghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi. *Majalah Obat Tradisional*. 2003; 8(25):1-5.
6. Firdaus TF., Suhartono E., Qamariah N. Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infus daun tapak dara (*Chararanthus roseus* [L] F.Don) sebagai penghambat kerusakan protein. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 2004; 36(1):1-6.
7. Suhartono E., Setiawan B., Edyson, Yuliasari N. Uji aktivitas antioksidan rebusan daun dewa (*Gynura Pseudichina*) sebagai inhibitor Advance Glycation End Products (AGEs) dan Senyawa dikarbonil akibat reaksi glikosilasi. *Mutiara Medika*.2004; 4(2):104-113.
8. Suhartono E., Rohman T., Setiawan B., Dedy O. Laju inhibisi Advance Glycation End Products oleh perasan belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) berdasarkan aktivitas antioksidan in vitro. *Majalah Obat Tradisional*. 2005; 10(31):7-11.
9. Suhartono E., Setiawan B., Edyson, Ramlah. Uji aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan perannya sebagai inhibitor Advance Glycation End Products (Senyawa dikarbonil) akibat reaksi glikosilasi. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 2005; 37(1):1-6.
10. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in

- experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2002; 51:3274-82.
11. Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J.Clin. Invest* 1997; 99:144-50.
 12. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE). *J. Clin. Invest.* 2001; 108:1853-63.
 13. Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr.* 2002; 132:897-900.
 14. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
 15. Beckett AH, Kalsi VS. *Compelling need for supplementation: "How specific nutrients help retard the complications of diabetes melitus.* Makalah pada Symposium "Compeling Need For Nutrient Therapy in The Treatment of Diabetes Mellitus and The Associated Complications; 2003 Februari 8, Surabaya, Indonesia: Pusat Diabetes dan Nutrisi Surabaya; 2003.
 16. Shoda H, Miyata S, Liu BF. Inhibitory effect of tenilsetam on the Maillard reaction. *Endocrinology* 1997; 138:1886-92.
 17. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D. Advanced Glycation End Product ligand for the receptor for Advanced Glycation End Product: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* 2004; 324:68-78.
 18. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y, et al. Protein-Bound acrolein: Potential markers for oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:4882-7.
 19. Sadikin M. *Pengukuran Konsentrasi Senyawa Karbonil.* Makalah dalam Kursus Penyegar dan Pelatihan: Radikal Bebas dan Antioksidan: Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam. Jakarta, 21-22, April 2001.
 20. Fessenden RJ, Fessenden JS. *Karbohidrat.* Dalam: Kimia organik, edisi ke 3 Alih bahasa: A. Hadyana Pudjaatmaka, Penerbit Erlangga. Jakarta. 1986.
 21. Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO. Oxidation-reduction properties of methyglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J. Biol. Chem*, 1998; 273:39.
 22. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
 23. Babloyantz A. *Molecules, dynamics & life: an introduction to self-organization of matter.* Singapore; John Wiley & Sons; 1986.
-