



Model pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) dan degradasi tirosin akibat reaksi maillard

Models of the formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and tyrosine degradation by Maillard reaction

Eko Suhartono¹⁾, Bambang Setiawan¹⁾, Mashuri²⁾

¹⁾Department of Medical Chemistry Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru

²⁾Department of Biochemistry Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru

KEYWORDS AGEs, tyrosine, Maillard reaction

ABSTRACT *Maillard reaction or glycosylation reaction is a reaction between amine group and aldehyde group from glucose to form dicarbonyl compound and Advanced Glycation End Products (AGEs). The formation of AGEs have a role in diabetic complications. This work was conducted study the tyrosine degradation reaction model and the formation of AGEs caused by Maillard reaction. The research design was an experimental study with pre and posttest control group design with followed up posttest in 48 hours to 20 days. Two solutions, A and B were used; solution A was a mixture of BSA 30% + buffer phosphate pH 7 + aquadest, and solution B was BSA 30%+ buffer phosphate pH 7+ aquadest+ glucose. The degradation of tyrosine was measured by its absorbance at $\lambda=470$ nm and the absorbance of AGEs formation at $\lambda=340$ nm. Model of AGEs formation in solution A followed the equation of $Y=0,0289X - 0,01847$ with correlation coefficient $R^2=0,9767$, where as that in solution B followed equation of $Y=0,6552X - 1,5267$ with correlation coefficient $R^2=0,9463$. The tyrosine degradation model in solution A followed equation of $Y=-0,1232X + 2,7166$ with correlations coefficient $R^2=0,9175$ where as that in solution B followed equation of $Y=-0,03552X + 0,7762$ with coefficient of correlation $R^2=0,9175$. Negative value was observed in correlation between AGEs absorbance with tyrosine in solution A and B reflecting the formation of AGEs followed by tyrosine degradation.*

Reaksi Maillard atau reaksi glikosilasi adalah reaksi antara gugus amina protein dengan gugus aldehid dari glukosa, yang selanjutnya akan menghasilkan senyawa dikarbonil dan *Advanced Glycation End Products* (AGEs). Reaksi ini dicirikan dengan terjadinya pencokelatan nonenzimatik antara gula pereduksi dan asam amino bebas yang reaktif dari protein (Baynes, 1999)

Di bidang teknologi pangan, reaksi Maillard digunakan untuk pemanufakturan makanan. Misalnya pembentukan warna coklat pada kulit luar roti. Hasil reaksi Maillard pada setiap jenis bahan pangan menunjukkan pola pencoklatan yang berbeda bergantung pada

sifat asam amino atau protein yang bereaksi dengan karbohidrat. Pada reaksi ini, asam amino lisin merupakan asam amino yang paling banyak mengalami kerusakan seiring dengan lamanya reaksi (deMan, 1997)

Di bidang kedokteran, reaksi Maillard dan pembentukan AGEs diduga turut mendasari komplikasi pada diabetes melitus. Pada diabetes melitus, reaksi diawali dengan keadaan hiperglikemia, yang selanjutnya akan

Correspondence:

Drs. Eko Suhartono, M.Si, Department of Medical Chemistry
Lambung Mangkurat University School of Medicine, Banjarbaru Jl.
A. Yani Km 36, Banjarbaru, South Kalimantan, Facsimile (0511)
773470 Hp. 08155047910

meningkatkan pembentukan basa Schiff antara gugus aldehid 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 (Forbes, 2002).

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa, reaksi Maillard dapat membentuk senyawa dikarbonil 7,5 kali dibandingkan dengan kontrol (Budianto, 2003; Firdaus, 2004). Selain itu akumulasi AGEs, sebagai hasil dari reaksi Maillard, dapat meningkatkan stress oksidatif di berbagai jaringan (Droge, 2002). Hasil penelitian Ueno (2002), juga mengungkapkan bahwa akumulasi AGEs akibat diabetes, secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak. Hasil penelitian Valencia (2004), mengungkapkan bahwa secara *in vitro* AGEs dapat dihasilkan dari reaksi bovine serum albumin dengan glukosa dan fruktosa.

Sebagaimana dijelaskan di atas, residu lisin, arginin, dan histidin merupakan asam amino yang mudah bereaksi dengan gugus aldehid pada glukosa. Pada penelitian ini ingin diketahui model reaksi degradasi tirosin dan model pembentukan AGEs akibat reaksi Maillard. Hal ini didasarkan atas 2 hal, yakni (a) reaksi Maillard bersifat acak (b) tirosin adalah asam amino nonesensial yang mudah teroksidasi. Selain itu, ingin diketahui pula korelasi antara degradasi tirosin dan pembentukan AGEs. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah serta menjadi acuan penelitian selanjutnya, khususnya dalam memahami mekanisme yang mendasari berbagai komplikasi pada diabetes mellitus.

BAHAN DAN CARA KERJA

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah penangas air, spektrofotometer merk Biosystem tipe BTS-305 photometer, oven merk

Hetto, pH meter (Cyberscan), dan alat-alat gelas (pyrex).

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Merck. Bahan-bahan tersebut antara lain glukosa (p.a), buffer fosfat pH 7,4 (p.a), BSA 30% (p.a), aquadest, NaOH 6N (teknis), NaNO₂ 0,2% (p.a), HgSO₄ 15% (p.a).

Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *pre and post test control group design* dengan *follow up post test* dilakukan setiap 48 jam. Variabel bebas pada penelitian ini adalah reaksi Maillard, sedangkan variabel terganggunanya adalah absorbansi AGEs dan tirosin. Metode penelitian yang digunakan adalah studi eksperimen. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat pada bulan April-Juli 2004.

Pengukuran absorbansi senyawa AGEs

Pengukuran AGEs dilakukan dengan metode yang digunakan oleh Valencia (2004). Pada penelitian ini, terlebih dahulu disiapkan 2 (dua) larutan, yakni larutan A (kontrol) dan larutan B. Larutan A dibuat dengan mencampurkan 8,3 ml BSA 30%, 20 ml buffer fosfat pH 7, dan aquadest 21 ml. Larutan B adalah campuran 8,3 ml BSA 30%, 20 ml buffer fosfat pH 7, aquadest 21 ml, dan 4,51 gr glukosa.

Kedua macam larutan tersebut kemudian disimpan di dalam oven pada suhu 37°C. Setiap akan mengukur absorbansi AGEs, maka terlebih dahulu diukur pH larutan A dan B. Apabila pH turun, maka ditambahkan NaOH 6N tetes demi tetes sampai pH 7,4. Pengukuran pH menggunakan pH meter.

Absorbansi senyawa AGEs diukur setiap 48 jam selama 20 hari. Caranya dengan mengambil sebanyak 0,5 ml larutan dari masing-masing larutan A dan B, kemudian diukur serapannya pada $\lambda = 340$ nm dengan menggunakan spektrofotometer.

Pengukuran absorbansi tirosin

Sebanyak 1 ml masing-masing larutan A dan B ditambah 1 ml NaOH 6 N. Kemudian masing-masing larutan direfluks di dalam penangas air selama 1 jam dengan suhu 60°C. Setelah itu, masing-masing larutan ditambahkan 3 ml HgSO₄ dan 2 ml NaNO₂. Larutan berwarna yang terbentuk diukur serapannya pada λ = 470 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

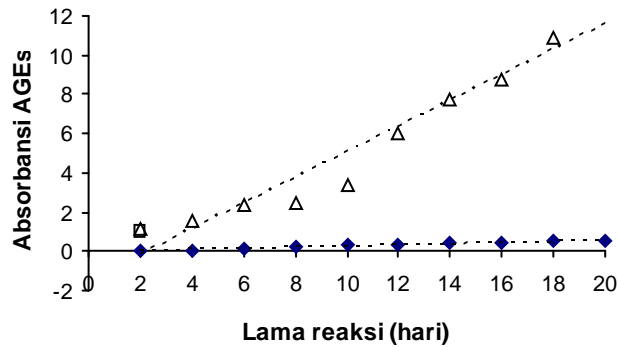
H A S I L

Setelah dilakukan pengamatan selama 20 hari, ternyata pembentukan AGEs pada larutan B meningkat sangat tajam dibandingkan dengan larutan A. Dengan menggunakan program Microsoft Excel, model pembentukan AGEs pada larutan A mengikuti persamaan $Y = 0,0289X - 0,01847$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9767$. Untuk larutan B, model pembentukan AGEs mengikuti persamaan $Y = 0,6552X - 1,5267$

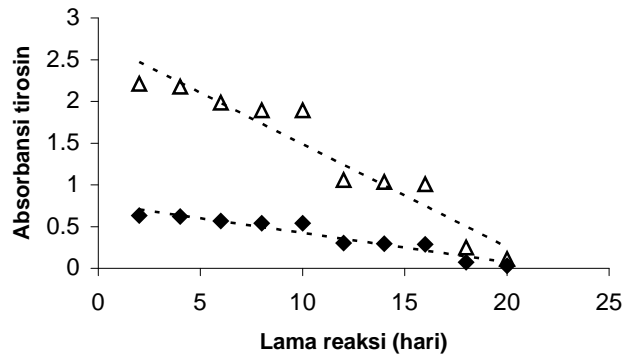
dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9493$. Model pembentukan AGEs disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1, pembentukan AGEs pada larutan B lebih cepat ≈ 23 kali larutan A.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan model degradasi tirosin pada larutan A dan B. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2. Model degradasi tirosin pada larutan A mengikuti persamaan $Y = -0,1232X + 2,7166$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9175$. Untuk larutan B, model degradasi mengikuti persamaan $Y = -0,0352X + 0,7762$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9175$. Sebagaimana terlihat pada Gambar 2, degradasi tirosin pada larutan B lebih cepat 3,5 kali larutan A.

Korelasi antara absorbansi AGEs dengan tirosin pada larutan A adalah $r = -0,94072$ ($p < 0,05$), sedangkan pada larutan B adalah $r = -0,9864$ ($p < 0,05$)



Gambar 1. Laju pembentukan AGEs berdasarkan nilai absorbansinya λ = 340 nm. Laju pembentukan AGEs larutan B, yakni larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM (--Δ--) lebih besar daripada larutan kontrol (--♦--)

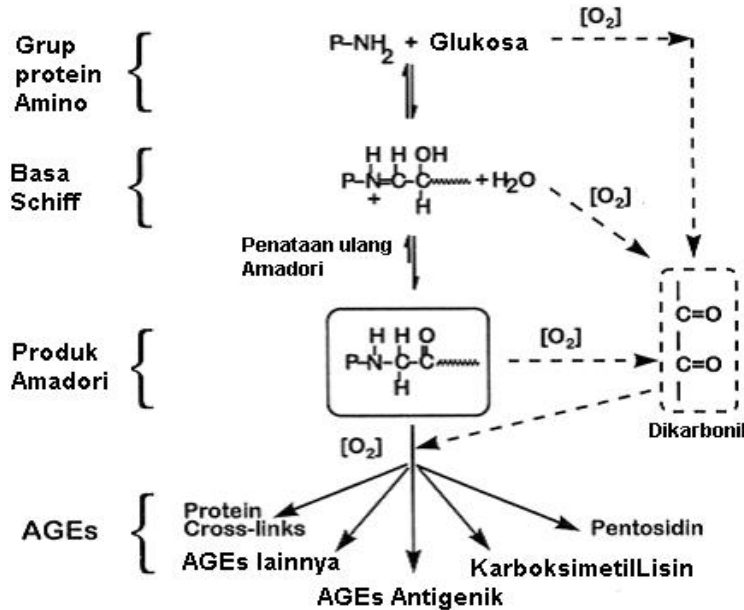


Gambar 2. Laju degradasi tirosin berdasarkan nilai absorbansinya λ = 470 nm. Laju degradasi tirosin larutan B, yakni larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM (--Δ--) lebih besar daripada larutan kontrol (--♦--)

PEMBAHASAN

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,

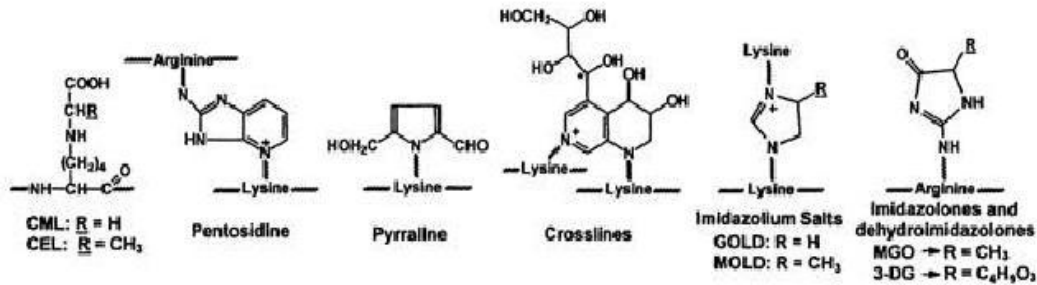
yakni sebagai pereduksi (Fassenden, 1986). Sifat pereduksi ini, memungkinkan gugus karbonil yang dimiliki glukosa akan bereaksi dengan gugus amina yang dimiliki oleh protein. Reaksi berkelanjutan antara gugus karbonil glukosa dengan gugus amina protein ini disebut reaksi Maillard. Mekanisme reaksi Maillard sehingga menghasilkan AGEs dijelaskan pada Gambar 3.



Gambar 3. 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 (-NH₂) protein. Hasil reaksi awal dikenal sebagai *basa schiff*, yang secara spontan mengalami penataan ulang menjadi produk Amadori. Penataan ulang produk Amadori menghasilkan senyawa dikarbonil (Lee, 1998)

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 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 (Baynes, 1999). Beberapa senyawa AGE ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Berbagai struktur AGE (CML: N-(carboxymethyl)lysine; CEL: N-(carboxyethyl)lysine; GOLD: Glyoxal-lysine dimer; MOLD: methylglyoxal-lysine dimer; MGO: methylglyoxal; 3-DG (3-deoxyglucosone) (Baynes, 1999)

Pada penelitian ini diperoleh korelasi negatif antara absorbansi AGEs dan tirosin. Hal ini dapat diartikan bahwa setiap pembentukan AGEs akan diikuti oleh penurunan kadar tirosin. 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 (Solomon, 1996). Dengan demikian, jika ditinjau dari keterangan Gambar 3 di atas, mungkin saja gugus -NH₂ yang bereaksi dengan glukosa bersumber dari tirosin, sehingga tirosin mengalami degradasi. Penelitian ini sesuai dengan penelitian Valencia (2004), yaitu pembentukan AGEs semakin meningkat seiring dengan lamanya inkubasi. Valencia (2004) menggunakan glukosa dan fruktosa sebagai sumber gugus karbonil, sedangkan bovine serum albumin digunakan sebagai sumber gugus amina. Penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Budianto (2004). Pada penelitian tersebut reaksi antara BSA 20% dengan glukosa 200 mg/dL selama 3 jam pada pH 7,4 menghasilkan senyawa karbonil sebesar 1,3788 ± 0,2011 µM.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas disimpulkan bahwa:

1. Model reaksi pembentukan AGEs pada larutan A mengikuti persamaan $Y = 0,0289X - 0,01847$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9767$, sedangkan untuk larutan B mengikuti persamaan $Y = 0,6552X - 1,5267$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9493$.
2. Model degradasi tirosin pada larutan A mengikuti persamaan $Y = -0,1232X + 2,7166$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9175$, sedangkan untuk larutan B mengikuti persamaan $Y = -0,0352X + 0,7762$ dengan koefisien korelasi $R^2 = 0,9175$.
3. Korelasi antara absorbansi AGEs dengan tirosin pada larutan A dan B bernilai negatif, sedangkan lama inkubasi terhadap absorbansi AGEs berkorelasi positif, tetapi terhadap tirosin berkorelasi negatif.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan, yakni penggunaan senyawa antioksidan untuk menghambat degradasi tirosin akibat reaksi Maillard.

KEPUSTAKAAN

- Baynes JW, Thorpe SR 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications, *Diabetes*, 48:1-9.
- Budianto R, Qamariah N, Suhartono E 2003. Potensi infus daun pare (*Momordica charantia*) sebagai penghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi, *Majalah Obat Tradisional*, 8(25):1-5
- Budianto R, Firdaus RT, Paramita D, Vianti TA, Damayanti ED Suhartono E 2004. Uji antioksidan tumbuhan pasak bumi (*Eurycoma Longifolia* Jack.) serta perannya sebagai inhibitor kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi, *Review Kimia*, 7(2):89-97

- deMan JM 1997. Kimia Makanan, terjemahan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Droge W 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*,82:47-95.
- Fessenden RJ, Fessenden JS 1986. Kimia organik, edisi ke 3 Alih bahasa: A. Hadyana Pudjaatmaka, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Firdaus TF, Suhartono E, Qamariah N 2004. Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infus daun tapak dara (*Chataranthus roseus* [L] F.Don) sebagai penghambat kerusakan protein, *Berkala Ilmu Kedokteran*,
- Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC 2002. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*, 51:3274-82.
- Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO 1998. Oxidation-reduction properties of methyglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem*, 273:39.
- Solomons GT 1996. *Organic Chemistry*, 6th edition, John Wiley & Sons, Singapore
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr.*,132:897-900.
- Valencia JV, Weldon SC, Quinn D 2004. Advanced Glycation End Product ligand for the receptor for Advanced Glycation End Product: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry*, 324:68-78.