SINYAL TRANSDUKSI DARI BROMELAIN SEBAGAI ANTIINFLAMASI PADA UDEMA TELAPAK KAKI TIKUS YANG DISEBABKAN OLEH KARAGEN

(THE SIGNAL TRANSDUCTION OF BROMELAIN AS ANTIINFLAMATORY IN CARRAGEENAN-INDUCED RAT PAW EDEMA)

Sri Agus Sudjarwo

Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRACT

The signal transduction of bromelain as antiinflammatory in carrageenan-induced rat paw edema were investigated. Sprague Dawley Rats were divided into the control groups which were given saline, and bromelain groups which received doses of 10, 20 and 40 mg/kg bromelain (peroral) respectively. This was followed by the administration of 1 % carrageenin through the intraplantar route 30 min after administration bromelain or saline. After the carrageenan injection paw volume, prostaglandin (PGE₂) production and cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 expression was measured. The bromelain in doses of 10, 20 and 40 mg/kg showed 11.3; 45.1 and 56.3 % inhibition of paw edema respectively at the end of three hours. The increase in Prostaglandin (PGE₂) levels after carrageenan injection was significantly prevented by preadministration of the bromelain at 20 and 40 mg/kg but not bromelain at 10 mg/kg. Bromelain a dose-dependent inhibited both COX-1 and COX-2 activity in carrageenin-induced inflammation. Bromelain inhibited COX-2 than COX-1 stronger activity. These results suggest that antiinflammatory effect of bromelain is due to its ability to inhibit PGE₂ production could be mediated by inhibition mainly on COX-2 than COX-1 activity.

Keywords: Bromelain, Cyclooxygenase, Prostaglandin

PENDAHULUAN

Telah diidentifikasi 2 macam *cyclooxygenase* (COX) yaitu COX-1 dan COX-2 yang tersebar luas dan banyak terdapat pada tempat inflamasi (1,2). COX-2 juga ditemukan pada macula densa dari ginjal dan otak (3,4). Penelitian farmakologi menunjukkan bahwa Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) yang ada di pasaran dapat menghambat kedua bentuk enzim COX (5). Telah dikembangkan dan diteliti obat penghambat selektif terhadap COX-2 yang mempunyai efek anti-inflamasi dan anti nyeri sama dengan NSAID (6).

Untuk mengevaluasi aktivitas anti inflamasi dari NSAID dapat digunakan model uema kaki tikus yang disebabkan oleh karagen. Model ini juga telah dipakai untuk mengevaluasi radang hiperalgesia (7). Karena NSAID bekerja menghambat pembentukan prostaglandin (PGE₂) melalui hambatannya pada COX, sehingga dipakai model ini untuk meneliti peran dari COX-1 dan COX-2, juga PGE₂ pada inflamasi (8,9). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 pada uema telapak kaki tikus yang disebabkan oleh karagen dapat diblok oleh penghambat selektif COX-2 dan oleh monoklonal antibodi PGE₂ (8,9). Hasil ini menunjukkan bahwa PGE₂ yang berasal dari COX-2 mempunyai peran penting pada awal dari inflamasi.

Telah dilaporkan bahwa bromelain mempunyai efek anti inflamasi pada tikus, namun mekanisme kerja dari bromelain sebagai anti inflamasi belum pernah diteliti (10). Karena efek anti inflamasi dari NSAID dapat disebabkan oleh hambatannya pada COX sehingga dapat menghambat pembentukan prostaglandin (PGE₂), maka diduga bahwa mekanisme kerja bromelain sebagai anti inflamasi juga dapat disebabkan oleh kemampuannya dalam menghambat produksi PGE₂ melalui hambatannya pada COX-1 atau COX-2.

Pada penelitian ini, telah diuji efek hambatan dari bromelain terhadap aktivitas COX-1 atau COX-2, dan produksi prostaglandin pada uema kaki tikus yang disebabkan oleh karagen.

METODE

Bahan kimia

Bromelain, karagen dan bahan kimia lain diperoleh dari Sigma Chemicals, Dorset, England. *Monoclonal anti-PGE₂ antibody 2B5* dari Jackson Immuno Research (West Grove, PA). *Rabbit anti COX-1 antibody* (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA). *Rabbit anti COX-2 antibody* (Cayman chemicals) dan *goat anti rabbit IgG-alkaline phosphatase* (Jackson Immuno Research, West Grove, PA)

Hewan coba

Tikus dewasa jantan dengan berat badan 200-250 g diperoleh dari Pusat Veterinary Farma Surabaya. Tikus (5 ekor per kandang) diberi makanan dan minuman ad libitum

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXI, No.1, April 2005

Korespondensi: Sri Agus Sudjarwo; Departemen Farmakologi FK Unair Surabaya, Jl. Prof. Moestopo 47 Surabaya.

e-mail: ags158@yahoo.com

dengan penerangan 12 jam / hari dan temperatur $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Prosedur penelitian dilakukan sesuai dengan peraturan komite etik hewan coba (11).

Inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen

Tikus dibagi dalam kelompok kontrol yang diberi larutan salin peroral, kelompok bromelain yang diberi 10, 20 dan 40 mg/kg bromelain (peroral) berturut-turut. 30 menit setelah pemberian bromelain atau larutan salin, kemudian diikuti dengan pemberian karagen 1 % secara intraplantar. Volume edema kaki tikus diukur dengan menggunakan *plethysmometrically* (Ugo Basile, Italy) pada '0' dan '3' jam setelah pemberian karagen (12,13). Prosentase aktivitas anti inflamasi merupakan prosentase hambatan edema kaki tikus antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang diberi bromelain yaitu = $(\text{Rata-rata kontrol} - \text{Rata-rata perlakuan}) \times 100 / \text{Rata-rata kontrol}$

Produksi prostaglandin pada edema kaki tikus.

Tikus di eutanasia dan kaki belakangnya diambil, kemudian di injeksi dengan larutan salin 0.1 ml yang berisi indometasin $10\ \mu\text{M}$ untuk menghilangkan cairan yang mengandung eikosanoid dan mencegah berlanjutnya produksi PGE_2 pada jaringan kaki tikus. Telapak kaki tikus di insisi dengan skapel, cairan eksudat di ambil dengan pipet eppendorf dan dimasukkan dalam tabung, kemudian di sentrifuse pada 1800 g selama 15 menit. Kadar PGE_2 pada eksudat kaki tikus diukur dengan menggunakan ELISA (Chantilly, VA) (14).

Eksresi COX-1 dan COX-2 pada edema kaki tikus.

Supernatan dari eksudat kaki tikus di sentrifuse pada 100 000 g selama 100 menit dengan suhu 4°C . Fraksi sitosolik dipakai untuk ekspresi protein dari fraksi mikrosom COX-1 dan COX-2. Protein diukur memakai metode Bradford dengan menggunakan serum albumin sapi sebagai standard. Dalam jumlah yang sama protein di pisahkan dengan SDS-PAGE 15 % dan dipindahkan ke dalam membran *polyvinylidene difluoride* selama 90 menit pada 125 mA. Membran diblok dalam *phosphate-buffered saline-Tween-20* (0.02 M, pH 7.0) yang berisi susu tanpa lemak 3% w/v dan diinkubasikan dengan *specific polyclonal antibody* untuk COX-1, COX-2 atau actin (1/1000). Akhirnya, membran diinkubasi dengan *peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG* (1/20 000). Pita imunoreaktif di visualisasi memakai sistem *chemiluminescence*.

HASIL PENELITIAN

Efek bromelain pada inflamasi kaki tikus yang disebabkan karagen

Hasil aktivitas anti inflamasi dari bromelain ditunjukkan pada Tabel 1. Pada model edema kaki tikus, bromelain dosis 10, 20 and 40 mg/kg, *p.o.* dapat menghambat inflamasi kaki tikus yang tergantung pada besarnya dosis yang diberikan. Pada dosis 10 mg/kg, bromelain mempunyai efek anti inflamasi ringan yang tidak berbeda nyata dengan kontrol. Sebaliknya, bromelain dosis 20 and 40 mg/kg, aktivitas anti inflamasinya berbeda nyata dengan kontrol ($P < 0.05$).

Tabel 1. Efek Bromelain pada Inflamasi Kaki Tikus yang Disebabkan oleh Karagen

Kelompok	Peningkatan volume udem kaki tikus (mean $\pm$ SEM) in ml	Prosentase hambatan
Kontrol	0.71 ± 0.13^a	-
Bromelain 10 mg/kg BW	0.63 ± 0.15^a	11.3
Bromelain 20 mg/kg BW	0.39 ± 0.08^b	45.1
Bromelain 40 mg/kg BW	0.31 ± 0.03^c	56.3

Keterangan: ^{a-c} berbeda nyata ($P < 0.05$), pada kolom yang sama.

Efek bromelain pada produksi PGE_2 .

Banyak penelitian yang menunjukkan adanya peran langsung dari PGE_2 pada inflamasi. Dalam penelitian ini diukur produksi PGE_2 pada tempat inflamasi. Tabel 2 menunjukkan bahwa berkurangnya inflamasi disertai dengan menurunnya kadar PGE_2 pada inflamasi kaki tikus.

Bromelain dosis 0, 10, 20 dan 40 mg/kg, peroral menyebabkan hambatan produksi PGE_2 yang tergantung besarnya dosis yaitu 6.1 ± 0.6 ; 5.9 ± 0.3 ; 4.8 ± 0.4 ; 3.9 ± 0.3 ng/ml, berturut-turut. Bromelain dosis 20 dan 40 mg/kg peroral berbeda nyata menghambat produksi PGE_2 pada inflamasi kaki tikus.

Tabel 2. Efek Bromelain Terhadap Produksi Prostaglandin pada Inflamasi Kaki Tikus yang Disebabkan oleh Karagen

Kelompok	Produksi prostaglandin (mean $\pm$ SEM) ng/ml
Kontrol	6.1 ± 0.6^a
Bromelain 10 mg/kg BW	5.9 ± 0.3^a
Bromelain 20 mg/kg BW	4.8 ± 0.4^b
Bromelain 40 mg/kg BW	3.9 ± 0.3^c

Keterangan: ^{a-c} significantly different at $P < 0.05$, in the same column.

Efek bromelain pada ekspresi COX-1 dan COX-2 dari inflamasi kaki tikus

Untuk menjelaskan efek hambatan dari bromelain pada aktivitas COX dari inflamasi kaki tikus diukur dengan memakai *western blot*. Protein dari COX ditentukan dengan menggunakan *polyclonal antibodies* untuk COX. Polypeptide COX dari plasenta domba dipakai sebagai kontrol positif. Gambar 1A menunjukkan bahwa bromelain tergantung besarnya dosis menghambat polypeptide COX-1 pada

posisi 70 kDa dari inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen. Gambar 1B juga menunjukkan bahwa bromelain tergantung besarnya dosis menghambat polypeptide COX-2 pada posisi 70 kDa dari inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen. Bromelain sangat kuat menghambat aktivitas COX-2 dari pada COX-1 dari inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen.

A) COX-1

B) COX-2

Gambar 1. *Western blot* dari polypeptide COX-1 (A) dan COX-2 (B) dengan tidak adanya (kolom 1) dan adanya bromelain pada dosis 10 mg/kg BB (kolom 2), 20 mg/kg BB (kolom 3) and 40 mg/kg BB (kolom 4). Polipeptide COX-1 (100 ng/kolom) vesikel seminal domba dan polypeptide COX-2 (80 ng/kolom) dari plasenta domba dipakai sebagai kontrol positif (kolom 5).

DISKUSI

Prostaglandin dihasilkan dari asam arakidonat dengan adanya aktivitas enzim siklooksigenase. Ekspresi ini ditemukan pada tempat inflamasi dari jaringan lunak dan berbagai macam aktivitas biologi. Model inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen telah lama digunakan untuk

mengevaluasi aktivitas antiinflamasi dari NSAIDs, dan ada hubungan yang baik antara efek pada model ini dengan aktivitas pada manusia (15,16). Pada inflamasi akibat karagen dapat terjadi pelepasan prostaglandin yang mencapai puncaknya pada 3 jam (14). Bromelain tergantung besarnya dosis dapat mengurangi inflamasi kaki

tikus akibat pemberian karagen. Bromelain dosis 20 and 40 mg/kg, *p.o.* menghasilkan hambatan yang berbeda nyata pada inflamasi tikus dibandingkan dengan kontrol. Pengukuran kadar PGE₂ dari cairan eksudat kaki tikus menunjukkan bahwa berkurangnya inflamasi sesuai bersamaan dengan menurunnya kadar PGE₂ dari inflamasi kaki tikus. Hasil ini sesuai dengan efek bromelain sebagai anti inflamasi dan konsisten dengan NSAIDs yang dipakai secara luas untuk pengobatan inflamasi dan nyeri yang bekerja melalui hambatan pada sintesa prostaglandin (10,17).

Model inflamasi akibat pemberian karagen juga telah dipakai untuk mengevaluasi peran dari COX pada inflamasi (7). Karena NSAIDs bekerja melalui hambatannya pada COX sehingga dapat menghambat pembentukan PG, maka dipakai model ini untuk mengetahui peran dari COX-1 dan COX-2, dan juga PGs, pada inflamasi kaki tikus (8,9). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekspresi dari COX-2 dapat terjadi pada inflamasi telapak kaki tikus akibat pemberian karagen dan dapat diblok oleh penghambat selektif COX-2 (9). Siklooksigenase adalah enzim yang mempengaruhi biosintesis prostaglandin (18). 2.8-kilobase Complementary DNA (cDNA) 2.8-kilobas dari COX di

kloning pada sel mamalia (19). Baru-baru ini, mRNA 4.1-kilobase dari mitogen COX telah diemukan pada mencit, manusia dan ayam (20,21,22).

Penelitian dengan menggunakan *western blotting* menunjukkan bahwa aktivitas seluler dari COX-1 dan COX-2 meningkat pada inflamasi yang disebabkan oleh karagen. Bromelain tergantung besarnya dosis lebih kuat menghambat aktivitas COX-2 dari pada COX-1 pada inflamasi yang disebabkan oleh karagen. Hasil ini menunjukkan bahwa efek antiinflamasi dari bromelain disebabkan oleh kemampuannya dalam menghambat produksi PGE₂ melalui hambatannya terutama pada aktivitas COX-2 dari pada COX-1 pada inflamasi kaki tikus yang disebabkan oleh karagen.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme kerja dari bromelain sebagai antiinflamasi disebabkan oleh kemampuannya dalam menghambat produksi PGE₂ melalui hambatannya terutama pada aktivitas COX-2 dari pada COX-1 pada inflamasi kaki tikus akibat pemberian karagen secara intra plantar.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V and Young DA. *A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein*. J. Biol. Chem 1991; 266: 23261-23267.
- Smith WL and DeWitt DL. *Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2*. Adv. Immuno 1996; 62: 167-215.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN and Breyer MD. *Cyclooxygenase-2 is Associated with the Macula Densa of Rat Kidney, and Increases with Salt Restriction*. J. Clin. Invest 1994; 94: 2504-2510.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer P and Isakson PC. *COX-2: A Synaptically Induced Enzyme Is Expressed By Excitatory Neurons At Postsynaptic Sites In Rat Cerebral Cortex*. U.S.A: Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 2317-2321.
- Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Koboldt C, Rangwala SH, Isakson PC and Seibert K. *Expression And Selective Inhibition Of The Constitutive And Inducible Forms of Human Cyclooxygenase*. J. Biochem 1995; 305: 479-484.
- Chan C, Boyce S, Brideau C, Ford-Hutchinson A W, Gordon R, Guay D, Hill RG, Li C, Mancini J, Penne-ton M, Prasit P, Rasori R, Riendeau D, Roy P, Tagari P, Vickers P, Wong E and Rodger IW. *Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: A Novel Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agent With An Ulcerogenic Sparing Effect In Rat And Nonhuman Primate Stomach*. J. Pharmacol. Exp. Ther 1995; 274: 1531-1537.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C and Joris J. *A New And Sensitive Method For Measuring Thermal Nociception In Cutaneous Hyperalgesia*. Pain 1988; 32: 77- 88.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA and Isakson PC. *Selective Neutralization of Prostaglandin E₂ Blocks Inflammation, Hyperalgesia, and Interleukin 6 Production In Vivo*. J. Exp. Med 1996; 184: 883-891.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson PC. *Pharmacological and Biochemical Demonstration of the Role of Cyclooxygenase 2 In Inflammation And Pain*. U.S.A: Proc. Natl. Acad. Sci. 1994; 91: 12013-12017.
- Sudjarwo SA. *The Analgesic and Antiinflammatory Activities of Bromelain*. Majalah Kedokteran YARSI. In Press. 2005
- Zimmermann M. *Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain Inconscious Animals*. Pain 1983; 16: 109-10.
- Somchit MN, Nur SMH. *Antiinflammatory Property of Ethanolic and Aqueousextracts of Zingiber Zerumbet*. Indian J Pharmacol 2003; 35:181-3.
- Zakaria MNM, Islam MW, Radhakrishnan R, Chen HB, Kamil M, Al-Gifri AN, etal. *Antinociceptive and antiinflammatory Properties of Caralluma arabica*. JEthnopharmacol 2001; 76:155-158.

14. Mnich SJ, Veenhuizen AW, Monahan JB, Sheehan KC, Lynch KR, Isakson PC and Portanova JP. *Characterization of a Monoclonal Antibody That Neutralizes the Activity of Prostaglandin E₂*. J. Immunol 1995; 155: 4437- 4444.
15. Winter CA, Risley EA and Nuss GW. *Carrageenan-induced Edema in Hind Paw of the Rat As An Assay For Antiinflammatory Drugs*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 1962; 111: 544-552.
16. Otterness IG and Bliven ML. *Laboratory Models For Testing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. In *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*, ed. by JG Lombardino. New York: Wiley; 1985; 111-252.
17. Smith JB and Willis AL. *Aspirin Selectively Inhibits Prostaglandin Production in Human Platelets*. Nature (Lond.): New Biol 1971; 231: 235-239.
18. Needleman P, Turk J, Morrison AR and Lefkowitz JB. *Arachidonic Acid Metabolism*. Annu Rev Biochem. 1986; 55: 69-102.
19. DeWitt D. *Prostaglandin Endoperoxide Synthase: Regulation of Enzyme Expression*. Biochim. Biophys. Acta 1991; 1083: 121-134.
20. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Herschman HR. *TIS10, A Phorbol Ester Tumor Promoter-Inducible mRNA from Swiss 3T3 Cells, Encodes A Novel Prostaglandin Synthase/Cyclooxygenase Homologue*. J. Biol. Chem 1991; 266: 12866-12872.
21. Hla T and Maciag T. *Cyclooxygenase Gene Expression Is Down Regulated by Heparin Binding Growth Factor-1 In Human Endothelial Cells*. J Biol Chem 1991; 266. 24059-24063
22. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL and Simmons DL. *Expression of A Mitogen-Responsive Gene Encoding Prostaglandin Synthase Is Regulated By Mrna Splicing*. U.S.A: Proc. Natl. Acad. Sci. 1991; 88: 2692-2696.