

PENGARUH ASPIRIN PADA AKTIVITAS GLUTATION S-TRANSFERASE KELAS μ HATI TIKUS

EFFECT OF ASPIRIN ON RAT LIVER CLASS- μ GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY

Enade Perdana Istyastono, Sudibyo Martono, dan Supardjan A.M.
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Inflamasi merupakan respon jaringan hidup akibat adanya luka pada jaringan tersebut. Inflamasi meliputi berbagai proses yang kompleks, terdiri atas deretan aktivasi enzim, pelepasan mediator, pengeluaran cairan, migrasi sel, pembongkaran dan perbaikan jaringan. Mediator inflamasi disintesis di dalam tubuh melalui berbagai tahap dan dikatalisis oleh berbagai enzim, antara lain enzim siklooksigenase dan glutathione S-transferase (GST) kelas μ pada metabolisme asam arakidonat jalur siklooksigenase. Aspirin merupakan obat anti-inflamasi non-steroid yang menghambat terbentuknya mediator inflamasi jalur siklooksigenase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aspirin sebagai obat anti-inflamasi non-steroid dalam penghambatan aktivitas GST kelas μ hati tikus secara *in vitro*.

Enzim GST dari fraksi sitosol hati tikus disiapkan dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren. Penetapan kadar protein dalam fraksi sitosol dilakukan secara spektrofotometri menggunakan baku *bovine* serum albumin. Kemudian dilakukan penentuan aktivitas GST pada reaksi konjugasi antara glutathione (GSH) dan 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), diikuti dengan penentuan nilai IC_{50} aspirin. Setelah itu dilakukan studi untuk mengetahui kemampuan aspirin dalam mempengaruhi aktivitas GST kelas μ hati tikus *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aspirin tidak berpengaruh menghambat aktivitas GST kelas μ hati tikus.

Kata kunci: Aspirin, anti-inflamasi, glutathione S-transferase.

ABSTRACT

Inflammation is the response of living tissues caused by injury. It involves a complex battery of enzyme activation, mediator release, extravasation of fluid, cell migration, tissue breakdown and repair. Inflammation mediator is synthesized in the body by several steps and catalyzed by several enzymes, such as cyclooxygenase and class- μ glutathione S-transferases (GSTs) in the cyclooxygenase arachidonic acid cascade. Aspirin, which has been reported as an inhibitor to inflammation mediator synthesis in the cyclooxygenase arachidonic acid cascade, is a non-steroid anti-inflammatory agent.

The aim of this research is to study the effect of aspirin on rat liver class- μ GST activity *in vitro*.

GSTs were isolated from the rat liver cytosolic fraction by centrifugation according to Lundgren. Protein concentration in the cytosol was determined spectrophotometrically using bovine serum albumin as a standard. The GST activity was determined using conjugation reaction rate between glutathione (GSH) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB), followed by determining IC_{50} of aspirin. Then, a study was done to determine the ability of aspirin in inhibition of the rat liver class- μ GST activity *in vitro*.

It can be concluded that aspirin has no inhibitory effect on rat liver class- μ GST activity.

Key word: Aspirin, anti-inflammatory, glutathione S-transferase.

PENDAHULUAN

Aspirin merupakan obat anti-inflamasi non-steroid yang memiliki kemampuan menghambat biosintesis prostaglandin yang merupakan salah satu mediator inflamasi (Vane dan Botting, 1996). Mediator inflamasi tersebut disintesis dari asam arakidonat dalam berbagai tahap dan dikatalisis oleh berbagai enzim dalam setiap tahapnya, antara lain glutathion S-transferase (GST) yang terlibat dalam pembentukan prostaglandin D₂, E₂, F₂ dari prostaglandin H₂ (Ujihara dkk., 1988).

GST merupakan kelompok enzim sitosolik multifungsional yang memegang peranan penting pada detoksifikasi senyawa ksenobiotik elektrofilik yang masuk ke dalam tubuh dengan jalan mengkatalisis reaksi konjugasi antara senyawa-senyawa elektrofilik tersebut dengan glutathion (GSH) pada sistem detoksifikasi fase II (Van der Aar dkk., 1998).

Kurkumin, turunan dan analognya yang dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi (Srimal dan Dhawan, 1973; Supardjan, 1999; Sardjiman, 2000) dilaporkan pula menurunkan aktivitas enzim GST (Sudibyo^a, 2000). Indometasin, suatu obat anti-inflamasi yang dilaporkan mekanismenya melalui penghambatan enzim siklooksigenase (Vane dan Botting, 1996), juga dikenal sebagai inhibitor GST (Hall dkk., 1989).

Pada beberapa keadaan tumor/kanker seperti kanker usus besar, payudara, paru, dan kulit, ekspresi GST meningkat, sehingga banyak obat antikanker yang akan dikonjugasikan menjadi metabolit tidak aktif dengan akibat menurunnya kemampuan obat tersebut untuk membunuh sel-sel kanker. Untuk meningkatkan efektivitas terapi, obat antikanker sering digabung dengan suatu inhibitor, seperti klorambusil (obat anti kanker) dengan indometasin (inhibitor GST) (Hall dkk., 1989). Oleh sebab itu penggunaan inhibitor dalam kasus ini sangat bermanfaat.

Pada penelitian ini akan dipelajari pengaruh aspirin pada aktivitas GST menggunakan percobaan model inhibisi pada reaksi konjugasi 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) dan GSH. Bila ternyata aspirin yang akan diteliti mampu menghambat aktivitas GST, maka di waktu mendatang dapat dilakukan penelitian senyawa tersebut bersama-sama dengan obat antikanker untuk meningkatkan efektivitas terapinya.

Hasil penelitian ini sangat bermanfaat untuk mengetahui apakah aspirin dapat menghambat aktivitas GST kelas μ hati tikus secara *in vitro*.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Aspirin (kualitas farmasetis Secifarma), glutathion dan *bovine* serum albumin (kualitas p.a. Sigma Chem. Co.). Zat warna untuk determinasi protein (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) (Bio-Rad). Etanol, kalium dihidrogen fosfat, dikalium hidrogen fosfat (kualitas p.a. E. Merck). 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) (Aldrich). Tikus putih (Strain Wistar) dari Toksikologi Fakultas Farmasi UGM.

Alat

Spektrofotometer Genesys 5 Milton Roy, pH meter TOA HM-5S, ultrasentrifuge (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, type L-SM).

Cara Penelitian

Penyiapan fraksi sitosol hati tikus yang mengandung glutathion S-transferase (GST)

Tikus jantan (strain Wistar, berat 200-220 g) sebanyak 15 ekor ditempatkan dalam kandang dengan makanan pellet dan diberi minum air ledeng selama 7 hari. Tikus dipuasakan 24 jam sebelum dibunuh dan diambil hatinya untuk penyiapan fraksi sitosol yang mengandung enzim GST dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren dkk. (1987) dengan sedikit modifikasi. Fraksi sitosol disimpan pada suhu -80 °C sampai saat digunakan.

Penetapan kadar protein fraksi sitosol yang mengandung GST.

Penetapan kadar protein dilakukan secara spektrofotometri dan menggunakan *bovine* serum albumin (BSA) sebagai pembanding (Bradford, 1976). Penetapan kadar dalam fraksi sitosol: 0,5 ml *Coomassie*

Brilliant Blue G-250 yang telah diencerkan + 10 µl fraksi sitosol, setelah tepat 5 menit serapan dibaca pada λ 595 nm dengan blanko *Coomassie Brilliant Blue G-250* encer.

Penentuan Aktivitas GST Hati Tikus.

Penentuan aktivitas GST menggunakan metode (modifikasi Habig dkk., 1974) campuran sitosol dan dapar sebagai berikut: Dapar fosfat (dibuat dari KH₂PO₄ dan K₂HPO₄) 0,1 M pH 7,5 (647,5 µl), fraksi sitosol (17,5 µl), GSH 50 mM (75 µl), DCNB 50 mM (10,0 µl). diinkubasi

Produk konjugat yang terbentuk diukur serapannya pada λ 345 nm pada menit 0-3 menggunakan spektrofotometer (program *Simple kinetic*). Hasil pengukuran berupa Δ serapan/menit (*rate*).

Penentuan IC₅₀ (konsentrasi inhibitor aspirin yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST hati tikus).

Percobaan dilakukan seperti prosedur penentuan aktivitas GST hati tikus, tetapi dengan penambahan aspirin dengan konsentrasi akhir 500, 600, 700, 800, dan 1000 µM..

Keterangan: Setelah penambahan aspirin, campuran diinkubasi selama 4 menit pada suhu kamar. Kecepatan pembentukan produk konjugat (V) dan % inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$V = \text{Rate} / \Delta \epsilon_{\text{GS-CNB}} \cdot \text{tebal kuvet} / \text{kadar protein dalam campuran inkubasi}$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi aspirin vs % inhibisi yang dihasilkan (Fitzpatrick dkk., 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh dari penyiapan fraksi sitosol hati tikus adalah berupa *crude* GST (GST yang belum dimurnikan). Penetapan kadar protein dalam fraksi sitosol hati tikus dilakukan menurut metode Bradford (1976) yang melibatkan terbentuknya ikatan antara *Coomassie Brilliant Blue G-250* dengan protein. Kadar protein dalam fraksi sitosol hati tikus pada penelitian ini sebesar 26,67 mg/ml.

Tabel I. Penetapan nilai IC₅₀ aspirin dengan substrat DCNB

Konsentrasi aspirin (µM)	Rate (serapan/menit)					V (nanomol/min/mg protein)	% inhibisi
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	purata		
0	0,050	0,052	0,051	0,053	0,052	39,216	
500	0,051	0,051	0,052	0,051	0,051	38,462	2,6
600	0,052	0,052	0,053	0,047	0,051	38,462	2,6
700	0,050	0,049	0,047	0,052	0,050	37,707	3,9
800	0,050	0,050	0,050	0,047	0,049	36,953	5,8
1000	0,048	0,050	0,047	0,045	0,048	36,199	7,7
a = - 3,5459 b = 0,0112 r = 0,976							
Persamaan regresi linier y = 0,0112x - 3,5459							
IC ₅₀ ^{a,b} aspirin = 4780,9 µM							

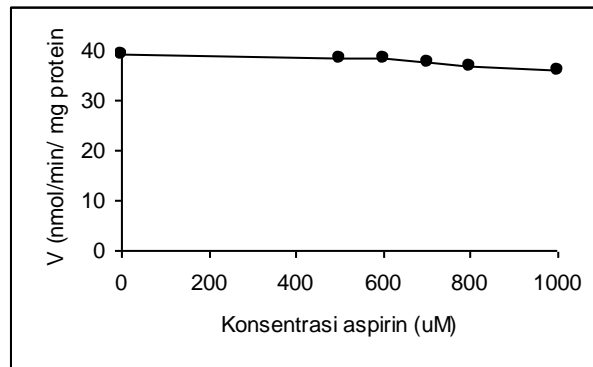
- Kadar akhir DCNB = 0,670 µM
- Kadar akhir GSH = 5 mM
- Kadar protein dalam campuran inkubasi = 0,156 mg/ml
- Bufor fosfat 0,1 M pH 7,5
- V = kecepatan pembentukan produk konjugat GSH-CNB

^a = nilai tersebut merupakan hasil ekstrapolasi

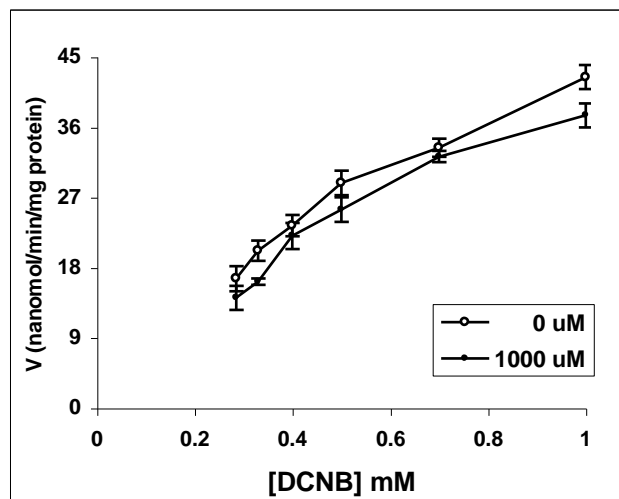
^b = nilai IC₅₀ diperoleh menggunakan persamaan garis regresi linier (kadar inhibitor vs % inhibisi)

Penetapan aktivitas GST kelas μ dari fraksi sitosol hati tikus (kadar protein 0,156 mg/ml) dengan substrat DCNB memberikan hasil sebesar 39,2 nanomol/min/mg protein (purata dari 4 replikasi dengan CV=2,5%). DCNB yang digunakan dalam penelitian ini merupakan substrat spesifik untuk GST kelas μ (Mannervik dan Danielson, 1988).

Hasil penetapan IC_{50} aspirin (Tabel I dan Gambar 1), dengan menggunakan substrat DCNB. Dari hasil penetapan IC_{50} aspirin diketahui bahwa aspirin bukan merupakan inhibitor GST kelas μ hati tikus karena hingga konsentrasi 1000 μM hanya menghasilkan penghambatan aktivitas GST kelas μ hati tikus sebesar 7,7 %. Selanjutnya dibuat kurva [Substrat] vs V (dengan atau tanpa inhibitor) untuk memperlihatkan kemampuan penurunan aktivitas GST kelas μ oleh aspirin (Gambar 2). Dari kurva [DCNB] vs V ini jelas terlihat bahwa keberadaan aspirin dalam sistem enzim substrat (dalam hal ini DCNB) tidak memberi pengaruh yang signifikan secara statistik (metode perbandingan kurva (*general linear model*) program komputer SPSS 10.05 dengan taraf kepercayaan 95 %) meskipun diberikan dalam konsentrasi sangat tinggi (1000 μM). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa aspirin praktis tidak menghambat aktivitas enzim GST kelas μ .



Gambar 1. Kurva hubungan konsentrasi aspirin dan aktivitas enzim GST pada reaksi konjugasi antara DCNB-GSH yang dikatalisis GST dalam medium bufer fosfat 0,1 M pH 7,5 yang diukur pada λ 345 nm selama 3 menit.



Gambar 2. Kurva [DCNB] vs V untuk memperlihatkan kemampuan aspirin dalam menurunkan aktivitas enzim GST kelas μ . V merupakan rata-rata dari replikasi 4 kali.

Ketidakmampuan aspirin menghambat aktivitas GST kelas μ diduga karena aspirin tidak atau sedikit sekali memiliki gugus yang dapat bersifat elektrofil. Hingga saat ini sebagian besar senyawa-senyawa yang bersifat sebagai inhibitor GST diketahui memiliki gugus yang bersifat elektrofil.

Kurkumin yang juga senyawa anti-inflamasi (Srimal dan Dhawan, 1973) memiliki gugus yang dengan mesomeri dan induksi dapat bersifat elektrofil. Beberapa senyawa turunan kurkumin (substitusi gugus metilen aktif) yang dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi (Supardjan, 1999) dilaporkan pula sebagai inhibitor GST kelas μ (Antarnusa, 2000; Agustina, 2000) dengan kekuatan inhibisi yang berbeda. Adanya gugus penarik elektron pada metilen aktif dari turunan kurkumin, secara struktural memungkinkan gugus OH fenolik semakin bermuatan parsial positif.

Keadaan tersebut sangat boleh jadi berkaitan dengan kemampuannya menghambat enzim GST kelas μ lebih kuat dibanding kurkumin. Sebaliknya, adanya gugus pendorong elektron pada metilen aktif dari turunan kurkumin, secara struktural memungkinkan gugus OH fenolik semakin berkurang muatan parsial positifnya. Keadaan tersebut sangat boleh jadi berkaitan dengan kemampuannya menghambat enzim GST kelas μ lebih lemah dibanding kurkumin.

Aspirin merupakan suatu senyawa yang memiliki gugus asam karboksilat dan ester. Dari penelitian Sudibyo^b (2000) diketahui bahwa keberadaan gugus asam karboksilat dan ester sebagai gugus samping senyawa-senyawa turunan metoksifenil (yaitu asam ferulat dan etil-*p*-metoksi sinamat) menunjukkan inhibisi aktivitas enzim GST yang sangat lemah. Pernyataan ini memperkuat hasil penelitian Das dkk. (1984) yang melaporkan bahwa senyawa-senyawa fenol alami dari tumbuh-tumbuhan terutama yang mengandung gugus asam karboksilat seperti asam ferulat, asam galat, asam kafeat, dan asam klorogenat, menunjukkan kemampuan inhibisi aktivitas GST lebih lemah dibanding asam elagat yang tidak mempunyai gugus asam karboksilat.

Meski asam elagat memiliki gugus ester tetapi asam elagat memiliki gugus penarik elektron dan gugus hidroksil yang secara struktural diperkirakan sifat elektrofiliknya relatif lebih kuat dibanding senyawa lain. Asam galat yang relatif tidak mempunyai gugus yang dapat bersifat elektrofilik (seperti aspirin) praktis tidak dapat menghambat aktivitas enzim GST (Das dkk., 1984).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aspirin tidak berpengaruh menghambat aktivitas glutathion S-transferase kelas μ hati tikus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada *QUE Project* Fakultas Farmasi UGM yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, 2000, Efek 4-Etil Kurkumin dan 4-Benzil Kurkumin terhadap Aktivitas Glutathion S-transferase Liver Tikus, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Antarnusa, D., 2000, Efek 4-(meta-trifluorometilfenil) Kurkumin dan 4-(orto-para-dinitrofenil) Kurkumin terhadap Aktivitas Glutathion S-transferase Liver Tikus, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Bradford, M.M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Das, M., Bickers, D. R., and Mukhtar, H., 1984, Plant Phenols as *In Vitro* Inhibitors of Glutathione S-Transferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120** (2), 427-433.
- Fitzpatrick, P.J., Krag, T.O.B., Hojrup, P., and Sheehan, D., 1995, Characterization of a Glutathione S-transferase and Related Glutathione-binding Protein from Gill of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*, *Biochem. J.*, **305**, 145-150.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B., 1974, Glutathione S-Transferase, The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, *J. Biol. Chem.*, **249** (22), 7130-7139.

- Hall, A., Robson, C.N., Hickson, I.D., Harris, A.L., Proctor, S.J., and Cattan, A.R., 1989, Possible Role of Inhibition of Glutathione S-transferase in the Partial Reversal of Chlorambucil Resistance by Indomethacin in Chinese Hamster Ovary Cell Line, *Cancer Res.*, **49**, 6265-6268.
- Lundgren, B., Meijer, J., and DePierre, J.W., 1987, Characterization of The Induction of Cytosolic and Microsomal Epoxide Hydrolases by 2-Ethylhexanoic Acid in Mouse Liver, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 114-121.
- Mannervik, B. and Danielson, V.H., 1988, Glutathione S-Transferase Structure and Catalytic Activity, *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337
- Sardjiman, 2000, Synthesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Anti-oxidative, Anti-inflammatory, Antibacterial Activities and Qualitative Structure-activity Relationship, *Dissertation*, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.
- Srimal, R.C. and Dhawan, B.N., 1973, Pharmacology of Diferuloyl Methane (Curcumin), a Non-steroidal Anti-inflammatory Agent, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 447-452.
- Sudibyo^a, M., 2000, *Inhibition of Glutathione S-transferase by Curcumin and Its Derivatives, Molecular Mechanisms and Qualitative Structure-activity Relationships*, Dissertation, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.
- Sudibyo^b, M., 2000, Pengaruh Senyawa-senyawa Turunan Metoksifenil terhadap Aktivitas Glutathion S-transferase Liver Tikus, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Supardjan, A. M., 1999, Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Some 4-substitued Curcumin Derivatives, *Dissertation*, Gadjah Mada University, Yogyakarta
- Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, H., and Urade, Y., 1988, Biochemical and Immunological Demonstration of Prostaglandin H₂ by Various GSTs Isoenzymes, *Archs. Biochem. Biophys.*, **264**, 428-437
- Van der Aar, E.M., Tan, K.T., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E., 1998, Strategies to Characterize the Mechanism of Action and the Active Site of Glutathione S-Transferases: A Review, *Drug Metab. Rev.*, **30**, 569-643.
- Vane, J.R. and Botting, R.M., 1996, Overview-mechanism of Action of Anti-inflammatory Drugs, in Vane, J.R., Botting, J., Botting R., (Eds.), *Improved Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs COX-2 Enzyme Inhibitors*, *Proceedings of a conference*, October 10-11, 1995, Regent's College, London, United Kingdom, 1-28.