

## Pengaruh aspirin pada aktivitas enzim glutathion S-transferase kelas *pi* ginjal tikus

### Effect of aspirin on pi-class of rat kidney glutathione S-transferase activity

Nunung Yuniarti, Sudibyo Martono dan Supardjan A.M.

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

---

#### Abstrak

Senyawa antiinflamasi nonsteroid (AINS) seperti kurkumin dan analognya, indometasin, dan sulfasalazin dilaporkan menghambat aktivitas enzim glutathion S-transferase (GST) secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aspirin (suatu AINS) pada aktivitas GST kelas *pi* (GSTP) ginjal tikus secara *in vitro*.

Aktivitas GST ditentukan dengan menggunakan reaksi konjugasi glutathion (GSH) dengan substrat spesifik asam etakrinat (AE). Konjugat GS-AE yang terbentuk diukur secara spektrofotometri dan menghasilkan suatu *rate* ( $\Delta$  serapan/menit). Dengan cara yang sama dilakukan reaksi konjugasi namun dengan penambahan aspirin sebagai inhibitor. Adanya efek inhibisi diketahui dari penurunan *rate*.

Hasil yang diperoleh menunjukkan pada konsentrasi 1000  $\mu\text{M}$ , % inhibisi aspirin sebesar 9,090% ( $\text{IC}_{50}$  ekstrapolasi 6665,03  $\mu\text{M}$ ). Aspirin diujikan pula pada substrat CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen). Hingga konsentrasi 1000  $\mu\text{M}$ , aspirin hanya menginhibisi 14,087% ( $\text{IC}_{50}$  ekstrapolasi 4102,0  $\mu\text{M}$ ), sehingga dapat diketahui bahwa aspirin tidak menghambat aktivitas GST sitosolik kelas *pi* ginjal tikus menggunakan substrat AE dan CDNB.

**Kata kunci:** aspirin, GSTP, ginjal.

#### Abstract

The nonsteroids antiinflammatory compounds like curcumin and its analogues, indomethacine, and sulfasalazin have been reported to have an inhibitory effect on GST activity on an *in vitro* study. The aim of this research is to find out the effect of aspirin on *pi*-class of rat kidney GST activity *in vitro* using ethacrynic acid (EA) as a specific substrate for its GST class.

Glutathione activity can be measured by conjugating GSH and EA catalyzed with GST. The product can be measured spectrophotometrically to result in a *rate* ( $\Delta$  absorption/min). With the same method, aspirin was added as an inhibitor. Decreasing conjugation product indicated that there was an inhibitory activity of aspirin.

The aspirin inhibitory activity using EA and CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as substrates are 9,090% (Extrapolated  $\text{IC}_{50}$  6665,03  $\mu\text{M}$ ) and 14,087% (Extrapolated  $\text{IC}_{50}$  4102,0  $\mu\text{M}$ ), respectively. These results have shown that aspirin can not inhibit *pi*-class of rat kidney cytosolic GST activity using EA and CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as substrates.

**Key words:** aspirin, GSTP, kidney.

---

## Pendahuluan

Pada tumor/kanker tertentu, sering dijumpai peningkatan aktivitas isoenzim GST, yang berarti sel tumor menunjukkan profil aktivitas yang berbeda dari sel normal. GST kelas *pi* adalah jenis GST yang paling sering dijumpai pada tumor manusia. GST kelas *pi-1* ditemukan dalam plasma pasien kanker ginjal, kolon, paru, lambung, dan payudara (Hayes dan Pulford, 1995).

Aktivitas berlebih dari GST dapat mengakibatkan resistensi sel kanker terhadap sitostatik karena sebagian besar sitostatik bersifat elektrofilik yang termetabolisme pada sistem detoksifikasi fase II mengalami konjugasi dengan GSH yang dikatalis oleh GST (Van der Aar *et. al.*, 1998) menjadi metabolit yang tidak aktif sehingga kemampuannya untuk membunuh sel-sel kanker menurun. Untuk meningkatkan efisiensi terapi, obat sitostatik sering digabung dengan suatu inhibitor enzim GST.

Serangkaian penelitian terhadap obat-obat AINS yang terkait dengan aktivitas enzim GST telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Sudibyo (1996) melaporkan: kurkumin yang memiliki aktivitas anti-inflamasi terbukti sebagai inhibitor kuat terhadap aktivitas GST dengan substrat CDNB. PGV-0 (Pentagamavunon-0), senyawa analog kurkumin, yang juga memiliki aktivitas anti-inflamasi terbukti sebagai inhibitor poten bagi aktivitas enzim GST kelas *mu* (substrat spesifik 1,2-dikloro-4-nitrobenzen/DCNB). Indometasin, AINS dengan mekanisme menghambat enzim siklooksigenase juga dikenal sebagai inhibitor GST. Dari uraian di atas, timbul permasalahan: apakah aspirin yang tergolong AINS dengan mekanisme menghambat enzim siklooksigenase juga memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim GST kelas *pi* pada ginjal tikus mengingat bahwa GST kelas *pi* merupakan jenis GST yang paling sering dijumpai pada tumor/kanker manusia. Pada penelitian ini digunakan ginjal tikus dan bukan liver tikus karena GST kelas *pi* dilaporkan lebih tinggi konsentrasinya pada ginjal tikus dibanding pada liver (Kelley *et. al.*, 1994) dan menggunakan substrat spesifik untuk GST kelas *pi* yaitu AE (Phillips and Mantle, 1991). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aspirin pada aktivitas enzim GST

kelas *pi* ginjal tikus pada reaksi konjugasi antara GSH dengan substrat AE secara *in vitro*.

## Metodologi

### Bahan

Aspirin, GSH dan BSA (Sigma Chem. Co.). Akuades, protein *determination* (Kit) (Bio-Rad), etanol, bufer fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (kualitas p.a. E. Merck). AE, CDNB (Aldrich). Tikus putih (strain Wistar) dan makanan tikus (pelet) dari Lab. Farmakologi dan Toksikologi Fak. Farmasi UGM.

### Alat

Spektrofotometer Genesys 5 Milton Roy, pH meter TOA HM-60S, ultrasentrifuge (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, type LS-6DT), *delivery* pipet (Gilson pipetman dengan berbagai ukuran), tip pipet (biru, putih, kuning) berbagai ukuran (Gilson) dan alat-alat gelas lain yang lazim digunakan.

### Jalannya Penelitian

#### Penyiapan fraksi sitosol ginjal tikus yang mengandung GST

Tikus jantan (Wistar, berat 200-220 g, 15 ekor) dikorbankan dengan mematahkan tulang belakang pada bagian leher, diambil ginjalnya dan dimasukkan ke dalam bufer fosfat dingin pH 7,5 kemudian ditimbang. Tikus dipuasakan 24 jam sebelum dikorbankan. Penyiapan fraksi sitosol ini menggunakan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren *et. al.* (1987) dengan sedikit modifikasi. Ginjal dihomogenkan menggunakan blender dingin dengan kecepatan 440 rpm. Homogenat diultrasentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 25 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh diultrasentrifugasi lagi dengan kecepatan 105.000 x g selama 90 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh merupakan fraksi sitosol yang mengandung GST. Fraksi sitosol disimpan pada suhu -80 °C sampai saat digunakan.

#### Penetapan kadar protein fraksi sitosol yang mengandung GST

Penetapan dilakukan secara spektrofotometri dan menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai pembanding (Bradford, 1976). Prosedur penetapannya: 0,5 ml Bio-rad:akuades (1:4) + 10,0 µl fraksi sitosol, setelah 5 menit serapan dibaca pada λ 595 nm terhadap blangko Bio-rad enceran. Untuk kurva baku dibuat larutan induk (Li) sebagai berikut: ditimbang 10,0 mg BSA + 5,0 ml akuades; diperoleh konsentrasi akhir Li: 2 µg/µl. Dari Li diambil volume tertentu sebagai berikut sehingga diperoleh lima seri konsentrasi protein:

Li (μl)	Akuades (μl)	Konsentrasi protein (μg/μl)
50,0	450,0	0,2
100,0	400,0	0,4
200,0	300,0	0,8
400,0	100,0	1,6
500,0	-	2,0

$$\text{Konsentrasi protein} = \frac{\text{Vol. Li}}{\text{Vol. total}} \times \text{konsentrasi Li } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

#### Penentuan aktivitas GST ginjal tikus

Digunakan campuran inkubasi (modifikasi Habig *et. al.*, 1974) sebagai berikut: bufer fosfat 0,1 M pH 7,5 (647,45 μl), fraksi sitosol (kadar protein tertentu) (17,5 μl), GSH 50 mM (dalam akuades) (75,0 μl), CDNB 50 mM (dalam etanol) (10,05 μl). Konjugat GS-AE yang terbentuk diukur serapannya pada λ 270 nm dari menit ke 0–3 menggunakan spektrofotometer (program *simple kinetic*).

#### Penentuan IC<sub>50</sub> (konsentrasi inhibitor aspirin yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST ginjal tikus)

Percobaan dilakukan seperti prosedur No. 3, tetapi dengan penambahan inhibitor 7,5 μl (aspirin dalam etanol) pada 5 macam variasi konsentrasi. Setelah penambahan inhibitor, campuran diinkubasi selama 4 menit pada suhu kamar dan dalam keadaan terlindung dari cahaya. Kecepatan pembentukan produk konjugat (V) dan % inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$V = \text{Rate}/\Delta\epsilon_{\text{GS-AE}}/\text{kadar protein dalam campuran inkubasi}$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{V_{\text{tanpa inhibitor}} - V_{\text{dengan inhibitor}}}{V_{\text{tanpa inhibitor}}} \times 100\%$$

#### Studi kinetik untuk menetapkan harga V<sub>maks</sub>, K<sub>m</sub>, K<sub>i</sub>, dan tipe inhibisi

Percobaan dilakukan seperti prosedur No. 3 tetapi tanpa inhibitor dan dengan inhibitor (1 macam konsentrasi di sekitar IC<sub>50</sub>) dengan menggunakan 5 macam variasi konsentrasi AE.

#### Hasil Dan Pembahasan

Penentuan aktivitas GST dilakukan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas GST dalam mengkatalis reaksi konjugasi GSH dengan AE dan CDNB tanpa adanya inhibitor. Aktivitas spesifik GST ditunjukkan dengan kecepatan pembentukan produk konjugat

GS-AE dan GS-DNB. Hasil pengukuran berupa Δ serapan/menit (*rate*) sebesar 0,042-0,045 serapan/menit. Aktivitas spesifik GST (V) dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\begin{aligned} V &= \text{rate}/\Delta\epsilon_{\text{GS-AE}}/\text{kadar protein dalam} \\ &\quad \text{campuran inkubasi} \\ &= 0,043 \text{ serapan}/\text{min} / 5,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} / \\ &\quad 0,404 \text{ mg}/\text{ml} \\ &= 21,287 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg protein} \end{aligned}$$

Enzim GST dalam fraksi sitosol ginjal tikus yang digunakan dalam penelitian ini tidak dimurnikan terlebih dahulu, sehingga tidak dapat ditentukan berapa jumlah (μg) enzim GST murni yang diperoleh. Oleh karena itu, aktivitas enzim dinyatakan dalam nanomol (nmol) dari produk yang dihasilkan per menit per mg protein yang terkandung dalam fraksi sitosol.

Penentuan IC<sub>50</sub> bertujuan untuk mengetahui potensi suatu inhibitor dalam menghambat aktivitas suatu enzim. Semakin kecil harganya berarti semakin poten/besar kemampuan inhibitor tersebut. Penetapan IC<sub>50</sub> aspirin dengan substrat AE dan CDNB memberikan hasil pada Tabel I dan Tabel II serta Gambar 2 dan Gambar 3. Sampai konsentrasi akhir aspirin 1000 μM, aspirin hanya memberikan efek inhibisi sebesar 9,090% (IC<sub>50</sub> ekstrapolasi: 6650,30 μM, substrat AE) dan 14,087 % (IC<sub>50</sub> ekstrapolasi 4102,0 μM, substrat CBNB), sehingga bisa dikatakan bahwa aspirin tidak menghambat aktivitas enzim GST sitosol kelas *pi* ginjal tikus dengan substrat AE maupun CDNB.

Hal ini karena aspirin (Gambar 4) tidak atau sedikit memiliki gugus elektrofil yang berperan dalam reaksi konjugasi dengan GS<sup>-</sup> dari reduksi GSH sehingga efek penghambatan tidak terjadi. Sebaliknya, AE sebagai substrat elektrofil yang reaktif (Mannervik *et. al.*, 1992) dan lebih elektrofil dari aspirin lebih mudah berkonjugasi dengan GS<sup>-</sup> dari GSH membentuk konjugat GS-AE (Gambar 1) yang kemudian menempati *binding site* (sisi pengikatan substrat) pada sisi H (*H-site*) enzim GST.

GSH merupakan *soft* nukleofil (istilah ini berhubungan dengan polarisabilitas atom Sulfur yang tinggi) yang bereaksi secara efisien

Tabel I. Penetapan nilai IC<sub>50</sub> aspirin dengan substrat AE

Konsentrasi aspirin (μM)	Rate (serapan/min)					V (nanomol/min/mg protein)	% inhibisi
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	purata		
0	0,044	0,045	0,042	0,043	0,044	21,782	-
100	0,041	0,044	0,044	0,041	0,043	21,287	2,273
200	0,044	0,040	0,044	0,041	0,042	20,792	4,545
600	0,044	0,041	0,041	0,042	0,042	20,792	4,545
800	0,038	0,038	0,040	0,042	0,040	19,802	9,090
1000	0,039	0,040	0,041	0,039	0,040	19,802	9,090

a = 2,0118

b = 0,0072

r = 0,911

Persamaan regresi linier  $y = 0,0072x + 2,0118$ IC<sub>50</sub><sup>a,b</sup> aspirin = 6650,30 μMTabel II. Penetapan nilai IC<sub>50</sub> aspirin dengan substrat CDNB

Konsentrasi aspirin (μM)	Rate (serapan/min)					V (nanomol/min/mg protein)	% inhibisi
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	purata		
0	0,070	0,072	0,069	0,073	0,071	28,778	-
100	0,072	0,071	0,071	0,067	0,070	28,372	1,411
200	0,069	0,067	0,066	0,068	0,068	27,562	4,226
400	0,066	0,067	0,068	0,065	0,067	27,156	5,636
800	0,067	0,066	0,062	0,063	0,065	26,346	8,451
1000	0,063	0,059	0,059	0,061	0,061	24,724	14,087

a = 0,7764

b = 0,012

r = 0,9624

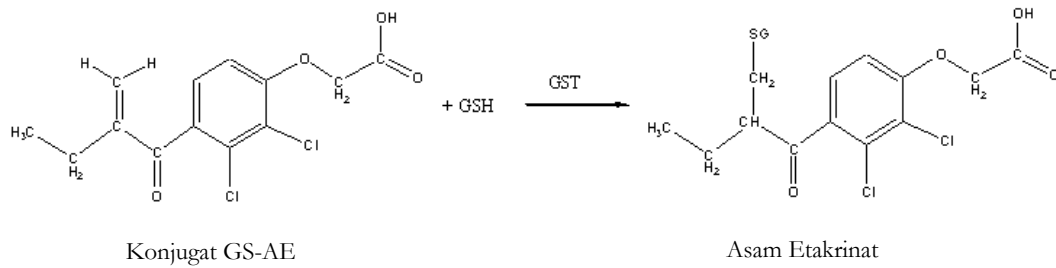
Persamaan regresi linier  $y = 0,012x + 0,7764$ IC<sub>50</sub><sup>a,b</sup> aspirin = 4102,0 μM

Keterangan Tabel I dan II:

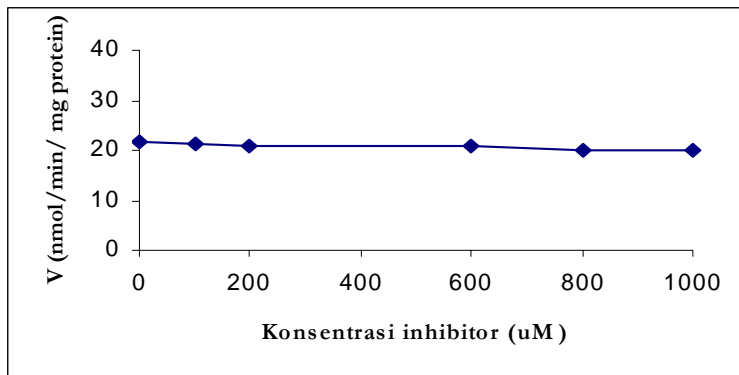
V = kecepatan pembentukan produk konjugat GS-AE dan GS-DNB

a = nilai tersebut merupakan hasil ekstra-polasi

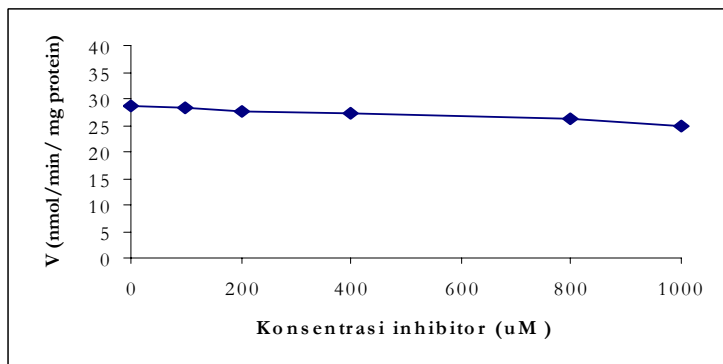
b = nilai IC<sub>50</sub> diperoleh menggunakan persamaan garis regresi linier (konsentrasi inhibitor vs % inhibisi)dengan *soft* elektrofil, seperti α,β-unsaturated keton misalnya AE (Ploemen *et. al.*, 1993).Reaksi konjugasi AE dengan GSH (Gambar 1) terjadi melalui adisi Michael pada ikatan rangkap yang melibatkan penambahan nukleofil GS<sup>-</sup> (Michael donor) kepada atom Cβ sehingga ikatan rangkap C=C terpolarisasimenghasilkan struktur jenuh karbonil (konjugat GS-AE). Efek substitusi gugus pendonor elektron pada atom Cα dan Cβ, efek sterik dan efek elektronik substituen yang berdekatan dengan cincin benzena pada AE berperan pada reaksi tersebut. AE bereaksi secara efisien dengan GSH, baik secara reaksi kimia biasa maupun secara reaksi enzimatik yang dikatalis oleh GST, oleh karena ia mempunyai gugus fungsional sebagai Michael *acceptor* (Van Bladeren dan Van Ommen, 1991).



Gambar 1. Reaksi konjugasi antara asam etakrinat dengan glutation



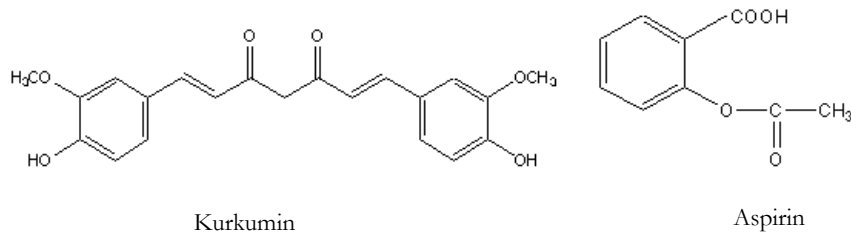
Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi inhibitor dan aktivitas enzim GST pada reaksi konjugasi antara AE GSH yang dikatalisis GST dalam medium bufer fosfat 0,1 M pH 6,5 yang diukur pada  $\lambda$  270 nm selama 3 menit



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi inhibitor dan aktivitas enzim GST pada reaksi konjugasi antara CDNB-GSH yang dikatalisis GST dalam medium bufer fosfat 0,1 M pH 6,5 yang diukur pada  $\lambda$  340 nm selama 3 menit

Sampai saat ini sebagian besar inhibitor GST diketahui memiliki gugus yang bersifat elektrofil. Kurkumin (Gambar 4) yang juga senyawa anti-inflamasi memiliki gugus yang karena mesomeri dan efek induksi dapat bersifat elektrofil. Dari penelitian Agustina

(2000) didapati bahwa substitusi bagian tengah kurkumin dengan gugus penarik elektron membuat OH-fenolik semakin parsial positif sehingga kemampuan menghambat menjadi lebih poten daripada kurkumin, sedangkan substitusi gugus pendorong elektron pada



Gambar 4. Struktur kurkumin dan aspirin

tempat yang sama yang menyebabkan OH-fenolik berkurang keparsialpositifannya menunjukkan kemampuan inhibisi sama atau kurang poten dibanding kurkumin.

Asprin (Gambar 4) merupakan suatu senyawa yang memiliki gugus samping berupa gugus asam karboksilat dan ester. Dari penelitian Sudibyo (2000) diketahui bahwa keberadaan gugus asam karboksilat dan ester sebagai gugus samping senyawa-senyawa turunan metoksi fenil (asam ferulat dan etil-*p*-metoksi sinamat) menunjukkan inhibisi yang sangat lemah terhadap enzim GST. Pernyataan ini juga diperkuat oleh Das *et. al.* (1984) yang meneliti pengaruh senyawa fenol alami dari tumbuhan terhadap aktivitas GST secara *in vitro*, dimana senyawa-senyawa yang mengandung gugus asam karboksilat (asam ferulat, asam galat, asam kafeat, asam klorogenat) menunjukkan kemampuan inhibisi

yang lemah terhadap enzim GST. Asam galat yang relatif tidak mempunyai gugus yang dapat bersifat elektrofilik (seperti aspirin) praktis tidak dapat menghambat aktivitas enzim GST.

Karena pada penetapan  $IC_{50}$  aspirin diketahui bahwa aspirin bukanlah inhibitor enzim GST kelas *pi* ginjal tikus, maka tidak dilakukan studi kinetika enzim GST.

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aspirin tidak menghambat aktivitas enzim glutation S-transferases kelas *pi* ginjal tikus.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Project Grant QUE Project Fak. Farmasi UGM sebagai sumber dana utama dalam penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Agustina, 2000, Efek 4-etil kurkumin dan 4-benzil kurkumin terhadap aktivitas glutation 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 quantites 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.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J., 1995, The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance, *Crit.Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 30 (6), 445-600.
- Kelley, M.K., Engquist-Goldstein, A., Montali, J.A., Wheatly, J.B., Schmidt Jr., D.E., and Kauvar, L.M., 1994, Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue, *Biochem. J.*, 304, 843-848.
- Lundgren, B., Meijer J., and DePierre, J.W., 1987, Characterization of the induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases by 2-etylhexanoic acid in mouse liver, *Drug Metab. Dispos.*, 15, 114-121.

- Mannervik, B., Widersten, M., Kolm, R.H., and Bjonestedt, R., 1992, Contribution of five amino acid residues in the glutathione-binding site to the function of human glutathione transferase P<sub>1-1</sub>, *Biochem. J.*, 285, 377-381.
- Phillips, M.F., and Mantle, T.J., 1991, The initial-rate kinetics of mouse glutathione S-transferase. Evidence for an allosteric site for ethacrynic acid, *Biochem. J.*, 275, 703-709.
- Ploemen, J.H.T.M., Bogaards, J.J.P., Veldink, G.A., Van Ommen, B., Jansen, D.H.M., and Van Bladeren, P.J., 1993, Isoenzyme selective irreversible inhibition of rat and human glutathione S-transferases by ethacrynic acid and two brominated derivatives, *Biochem. Pharmacol.*, 45, 633-639.
- Sudibyoy, M., 1996, Inhibition effect of curcumin and its analogues on *in vitro* rat liver glutathione S-transferases activity, *Indon. J. Pharm.*, 7 (1), 39-51.
- Van Bladeren, P.J. and Van Ommen, B., 1991, The inhibition of glutathione S transferase: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits, *Pharmacol. Ther.*, 51, 35-46.
- Van der Aar, E.M., Tan, K.T., Commandeur, J.N.M., and Varmeulen N.P.E., 1998, Strategies to Characterize the Mechanisms of Action and the Active Site of Glutathion S-Transferases : A Review, *Drug Metab. Rev.*, 30, (3), 569-645.