

## Efek Kurkumin terhadap Aktivitas Enzim Glutation Reduktase Mitokondria Hati Tikus yang diinduksi dengan Butilhidroperoksida-tercier (t-BHP).

Syamsudin\*, Suyatna F.D.\*\*, Ganiswarna S.\*\*, Sadikin M.\*\*\*

\* Bagian Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta

\*\* Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

\*\*\*Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

### Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang pengaruh pemberian kurkumin terhadap aktivitas enzim glutathione peroxidase terhadap kerusakan mitokondria hati tikus yang diinduksi dengan t-BHP. Induksi t-BHP dosis 400  $\mu\text{M}$  menyebabkan penurunan aktivitas enzim glutathione reductase dari  $(0,015 \pm 0,03)$  menjadi  $(0,006 \pm 0,01)$   $\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{mg}$  protein. Kurkumin dosis 60  $\mu\text{M}$  dapat meningkatkan aktivitas glutathione peroxidase menjadi  $(0,016 \pm 0,02)$   $\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{mg}$  protein.

**Kata kunci :** glutathione reductase, t-BHP, kurkumin, mitokondria.

### Abstract

This study was conducted to prove the hypothesis that curcumin could prevent the oxidative damage of rat liver mitochondria induced by t-BHP. The induction of 400  $\mu\text{M}$  t-BHP reduced Glutathione Reductase (GR) activity from  $(0,015 \pm 0,03)$  to  $(0,006 \pm 0,01)$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein. Instillation of Curcumin of 60  $\mu\text{M}$  could elevate GR activity to  $(0,016 \pm 0,002)$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

**Keyword :** glutathione reductase, t-BHP, curcumin, mitochondria.

### Pendahuluan

Sampai saat ini belum ada obat khusus untuk penyakit hati, apalagi setelah obat golongan hepatoprotektor ditarik dari peredaran berdasarkan keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia tahun 1985. Namun demikian penggunaan obat yang berasal dari tumbuhan masih banyak dilakukan dikalangan masyarakat Indonesia. Salah satu contoh obat tradisional yang banyak

digunakan adalah kurkumin. Kurkumin bukan hanya berasal dari isolasi tumbuhan keluarga Zingiberaceae tetapi dapat juga melalui sintesis kimia<sup>1</sup>.

Banyak penelitian mengenai efek kurkumin baik secara *in vitro* maupun *in vivo* diantaranya sebagai antioksidan dan hepatoprotektor<sup>2,3</sup>. Efek proteksi kurkumin pertama kali diteliti oleh Kiso<sup>4</sup> secara *in vitro* dengan menggunakan kultur hepatosit tikus. Suyatna<sup>5</sup> ber-

hasil membuktikan efek langsung kurkumin terhadap mitokondria hati tikus yang diinduksi dengan t-BHP suatu senyawa yang menghasilkan radikal bebas. Pada penelitian lainnya diperlihatkan adanya peningkatan aktivitas glutathion peroksidase dari mitokondria hati tikus yang diinduksi oleh t-BHP<sup>6</sup>. Pada penelitian ini hendak dilihat pengaruh kurkumin terhadap enzim glutathion reduktase mitokondria hati tikus yang diinduksi dengan t-BHP.

Mitokondria memiliki sistem pertahanan terhadap spesies oksigen reaktif seperti dengan adanya sistem redoks glutathion yaitu: glutathion (GSH), glutathion reduktase, glutathion peroksidase dan NADPH. Sistem ini dapat mereduksi adanya radikal bebas<sup>7</sup>. Glutathion reduktase dan glutathion peroksidase terdapat di dalam ruang antar membran mitokondria dan mereka dapat bereaksi dengan glutathion dan NADPH yang terdapat di intra dan ekstra mitokondria<sup>8</sup>.

## Metodologi

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah Kurkumin (Sigma C 1386), Sukrosa, EGTA Ethyleneglycol bis ( $\beta$ -aminoethyleter)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Sigma E 3889), Tris HCl (Sigma T6666), BSA Bovin Serum Albumin (Sigma A 2153), t-BHP Butilhidroperoksida tersier (Sigma B 2633), Kalium sianida, Natrium suksinat, Glutathion, Natrium azida, Natrium fosfat, NADPH, 2,6-dikloro-fenol indofenol.

### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Homogenizer (Potter-Elvehjen Tissue Grinders Cat No. 358013), Hitachi Automatic Refrigerated Centrifuge 18 PR-5, Vortex Ultra Turrax

T-25 Janke dan Kunkel, Spektrofotometer UV-Visible Lambda 3P-Perkin Elmer.

## Jalannya Penelitian

Tikus didekapitasi, kemudian diambil hatinya dan dilakukan isolasi mitokondria. Untuk mengetahui tingkat kemurnian fraksi mitokondria yang diperoleh, dilakukan pengukuran kadar protein pada fraksi homogenate dan fraksi mitokondria. Tiap bagian fraksi mitokondria dibagi menjadi kelompok : kontrol (K), kelompok yang diinduksi t-BHP 70-90  $\mu\text{mol/mg.protein}$  (ID), kelompok kurkumin dosis 1  $\mu\text{M}$  (IDK<sub>1</sub>), kelompok kurkumin dosis 60  $\mu\text{M}$  (IDK<sub>60</sub>) dan kelompok kurkumin dosis 3600  $\mu\text{M}$  (IDK<sub>3600</sub>).

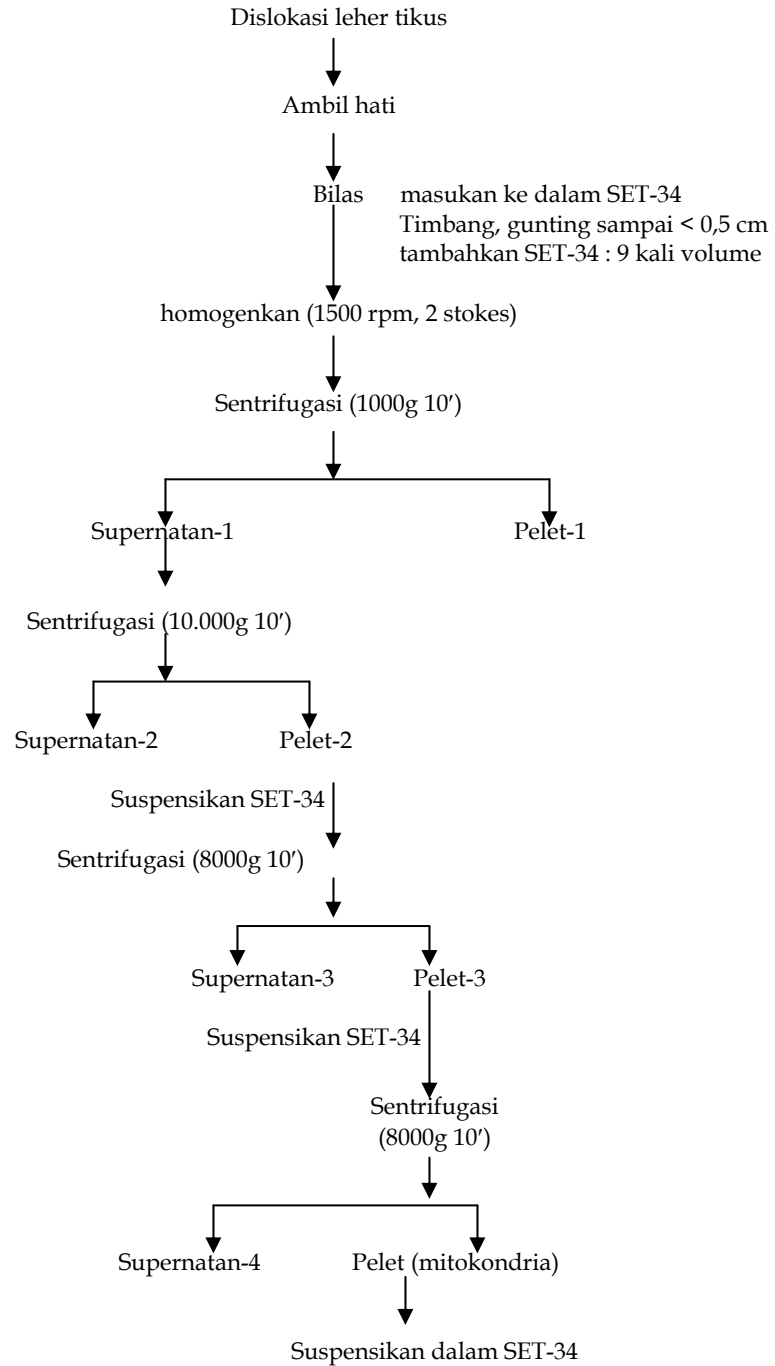
## Isolasi Mitokondria

Tikus dibunuh dengan cara dekapitasi. Hati diambil, ditimbang dan dihomogenkan dalam larutan dapar SET-34 pH 7,4 (Sukrosa 340 mM, EGTA 1 mM dan BSA 0,05%) dengan homogenizer pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit dengan dua kali turun-naik. Homogenat yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan rendah selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 10 menit untuk mendapatkan pelet mitokondria, kemudian dilakukan pencucian dua kali dengan medium SET-34 dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 g selama 10 menit. Pelet mitokondria yang dihasilkan disuspensi dalam medium SET tanpa BSA<sup>9</sup>.

## Pengukuran Aktivitas Enzim Suksinat Dehidrogenase (SDH).

Sampel diencerkan dalam medium SET-34 tanpa BSA sampai dipero-

leher pengenceran yang sesuai (5,3-7,2 mg protein/ml). 40 µl sampel ditambahkan



**Gambar 1. Skema isolasi mitokondria**

pada campuran yang terdiri atas 120 µl dapar natrium fosfat 800 mM pH 7,6; 120 µl Kalium sianida (KCN) 10 mM, 240 µl natrium suksinat 100 mM, 48 µl 2,6-diklorofenol indofenol 1 mM dan 632 µl air suling di dalam kuvet. Ukur serapan pada  $\lambda$  600 nm pada suhu 37°C selama 3 menit<sup>10</sup>.

#### **Pengukuran Aktivitas Enzim Glutation Reduktase ( GR ).**

100 µL sampel ditambahkan pada campuran yang terdiri atas 200 µL dapar kalium fosfat, 200 µL EDTA 3,5 mM, 100 µL NADPH 0,7 mM. Campuran ini diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, kemudian kedalam campuran ini ditambahkan 100 µL GSSG 3,5 mM. Selanjutnya serapan dibaca pada panjang gelombang 340 nm selama 5 menit pada suhu 25°C<sup>11</sup>.

#### **Analisis statistik**

Data hasil pengukuran merupakan data numerik dan dikumpulkan dari fraksi mitokondria yang sama. Data yang diperoleh diperlakukan sebagai data berkaitan dan dibuktikan dengan uji Anova satu arah. Untuk ke-lompok uji yang memiliki perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji Tukey. Batas kemaknaan yang digunakan  $p < 0,05$ .

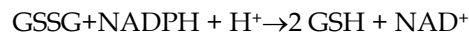
#### **Pembahasan**

Hasil pengukuran aktivitas enzim SDH memperlihatkan kandungan enzim petanda dan tingkat kemurnian mitokondria yang diisolasi dari homogenat hati (tabel 1).

Aktivitas spesifik (SA) SDH dalam fraksi mitokondria diperoleh

40,09 nmol/menit/mg protein, sedangkan dalam fraksi homogenat 9,92 nmol/menit/mg protein. Lash dkk.<sup>12</sup>, melaporkan untuk mengetahui tingkat kemurnian dari mitokondria yang diisolasi yaitu dengan mengukur enzim petanda dari fraksi mitokondria. Pada umumnya nilai pengayaan berbagai enzim petanda dalam fraksi mitokondria sekurang-kurangnya 2,5. Di sini terlihat bahwa SDH merupakan enzim petanda mitokondria yang terdapat dalam jumlah besar dibandingkan dalam fraksi homogenat, dengan demikian fraksi mitokondria yang diperoleh cukup murni.

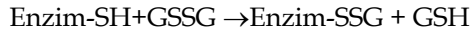
Aktivitas GR naik sebesar 128% setelah pemberian t-BHP dosis 100 µM, hal ini menunjukkan bahwa t-BHP meningkatkan produksi GSSG sehingga perlu direduksi kembali menjadi GSH oleh glutation reduktase. Reaksinya adalah sebagai berikut:



Akan tetapi peningkatan dosis t-BHP selanjutnya sampai 200 µM menurunkan aktivitas enzim glutation reduktase. Dasar dari peristiwa ini adalah diduga karena inaktivasi fungsi GR atau akumulasi metabolit radikal bebas atau keduanya. Dalam penelitian lain ditemukan adanya peta protein tertentu mitokondria yang hilang akibat t-BHP. Kurkumin dapat mencegah kehilangan pita protein tersebut<sup>13</sup>. Jika ini berlaku umum untuk protein mitokondria, maka terdapat kemungkinan inaktivasi GR bukan karena cedera (permanen) protein GR akan tetapi lebih karena disebabkan akumulasi metabolit tertentu hasil reaksi dengan radikal bebas (t-BHP).

Olafsdotter dkk.<sup>14</sup>, melaporkan GSSG yang terbentuk tidak dapat keluar dari mitokondria sehingga akan diakumulasi jika kemampuan untuk mereduksi

si GSSG menjadi GSH berkurang. Reaksinya adalah sebagai berikut:



Menurut penelitian tersebut GSSG diduga menyebabkan stress oksidatif.

Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan analisis varians satu jalan ternyata terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ) hal ini berarti kelompok dosis tersebut berbeda nyata atau tidak identik. Setelah dilanjutkan dengan uji antar kelompok perlakuan dengan Tukey ternyata bahwa:

1. Kelompok kontrol dan kelompok ID dan IDK<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ )
2. Antara kelompok ID, IDK<sub>3600</sub> dan IDK<sub>60</sub>, IDK<sub>1</sub> dan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ )

Dari hasil uji statistik diketahui bahwa kurkumin dosis 60  $\mu\text{M}$  mempunyai efek paling baik dibandingkan dosis 3600  $\mu\text{M}$  dalam melindungi kerusakan mitokondria

yang diakibatkan induksi dengan t-BHP yaitu dengan meningkatkan aktivitas enzim GR sebesar 167% dibandingkan 50%.

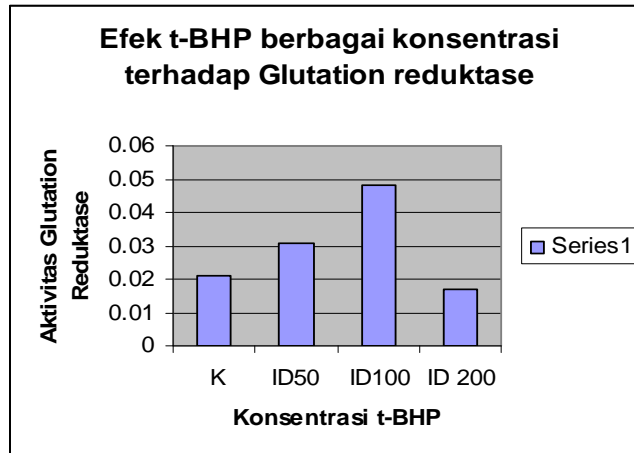
Peningkatan aktivitas GR pada kelompok yang diberikan kurkumin kemungkinan disebabkan karena kurkumin merupakan *scavenger* radikal bebas. Akan tetapi pemberian kurkumin dosis 1  $\mu\text{M}$  tidak terlihat peningkatan aktivitas GR dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada dosis ini kadar kurkumin sangat rendah sehingga tidak mempunyai efek antioksidan atau karena adanya sifat prooksidan. Sifat prooksidan kurkumin ditemukan oleh Kunchandy dkk.<sup>15</sup>, dimana kurkumin menyebabkan peningkatan reduksi ion feri menjadi fero pada reaksi fenton. Menurut Kunchandy kurkumin pada dosis tinggi bekerja sebagai scavenger radikal hidroksil tetapi pada konsentrasi rendah (0,61  $\mu\text{M}$ ) meningkatkan pembentukan radikal hidroksil.

**Tabel 1. Specific Activity (SA) dan Relative Specific Activity (RSA) enzim Suksinat Dehidrogenase (SDH) pada masing-masing fraksi.**

Fraksi	Protein (%homogenat)	SDH	
		SA	RSA
Homogenat	100	9,92±3,8	
Mitokondria	11,8	40,09±10,9	34,24

Keterangan : SA satuan nmol/menit/mg protein

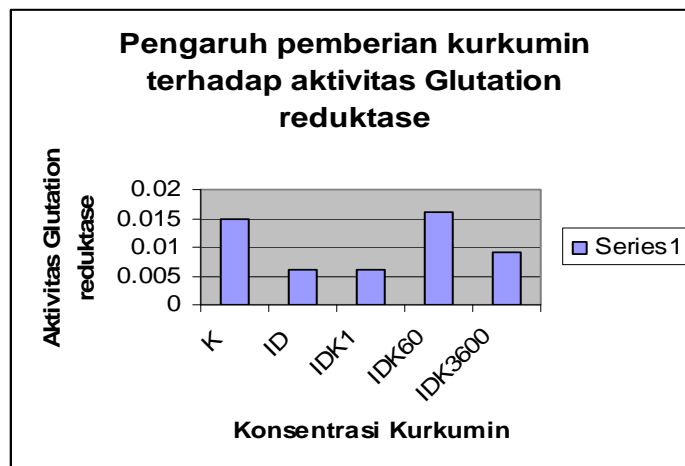
RSA (% dari SA) enzim petanda pada fraksi homogenate total dibagi dengan % dari protein pada suatu fraksi terhadap protein total.



Gambar 2. Efek t-BHP berbagai konsentrasi terhadap Glutation Reduktase Mitokondria Hati Tikus

Keterangan :

- K : Kelompok kontrol
- ID<sub>50</sub> : Kelompok induksi t-BHP 50  $\mu$ M
- ID<sub>100</sub> : Kelompok induksi t-BHP 100  $\mu$ M
- ID<sub>200</sub> : Kelompok induksi t-BHP 200  $\mu$ M



Gambar 3. Pengaruh pemberian kurkumin berbagai konsentrasi terhadap Glutation reduktase Mitokondria hati tikus

- Keterangan :
- K : Kelompok kontrol normal
  - ID : Kelompok induksi t-BHP 200  $\mu$ M
  - ID<sub>k1</sub> : Kelompok induksi t-BHP 200  $\mu$ M + Kurkumin konsentrasi 1  $\mu$ M
  - ID<sub>k60</sub> : Kelompok induksi t-BHP 200  $\mu$ M + Kurkumin konsentrasi 60  $\mu$ M
  - ID<sub>k3600</sub> : Kelompok induksi t-BHP 200  $\mu$ M + Kurkumin konsentrasi 3600  $\mu$ M

## Kesimpulan

Kurkumin dapat mencegah kerusakan mitokondria yang disebabkan oleh oksidan t-BHP yang dinilai dari peningkatan aktivitas enzim glutatone reduktase.

## Daftar Pustaka

1. **Tonnesen H, Greenhill J.** Studies on Curcumin and Curcuminoids: XXII Curcumin as a Reducing Agents as a Radical Scavenger. *International Journal of Pharmaceutical*, 1992; 87:79-87.
2. **Suyatna FD, Gan S, Siswoyo K, Asikin N, Rosmiati H, Pringgo Utomo.** The Effects of the Curcuma Againts Paracetamol-induced Liver Damage in Rats *Medical Journal of University of Indonesia*, 1992; **1(1):20**.
3. **Rao, MNA.** Antioxidant Properties of Curcumin. Disampaikan pada International Symposium on Curcumin Pharmacochemistry (ISCP). Fakultas Farmasi UGM bekerja sama dengan The Department of Pharmacochemistry Vrije Universiteit Amsterdam. Yogyakarta, 1995.
4. **Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N et al.** Antihepatotoxic Principle of Curcuma longa Rhizomes. *Planta Medica*, 1983 ; 49:85-87.
5. **Suyatna FD, Djohan R, Syamsudin, Nafrialdi, Suherman S.** The antioxidant effect of curcumin on rat liver mitochondrial dysfunction induced by t-butylhydroper-oxide I. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*. 2004.
6. **Syamsudin, Suyatna FD, Ganiswarna S, Sadikin M.** Efek Kurkumin terhadap aktivitas Enzim Glutation Peroksidase Mitokon-dria Hati Tikus yang dengan t-BHP. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 2005; 2(2).
7. **Richter C, Gogvadze V, Laffanchi R et al.** Oxidant in Mitochondrial from Physiology to Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995; 1272:67-74.
8. **Meister A.** Mitochondrial Changes Associated with Glutathione Deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995; 1271:35-42.
9. **Toward NR, Dixon H, Kellerman GM.** The Sensitive of Rat Liver Mitochondria to Antibiotics: a phylogenetic difference between a mammalian system and yeast. *Biogenesis of Mitochondrial*. 1972.
10. **Rendina G.** Experimental Methods in Modern Biochemistry. 1989; 284.
11. **Zanneti, G.** Rabbit Liver Glutathione Reductase Purification and Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1979; 198: 241-246.
12. **Lash LH, Sall J.** Mitochondrial Isolation from Liver and Kidney, Strategy Techniques And Criteria for Purity In: Jones D, Lash LH, Editors. *Mitochondrial Dysfunction*. Academic Press Inc, 1993; 8-21.
13. **Susilowati S.** Efek Kurkumin terhadap Swelling. Kegagalan Potensial Transmembran dan Perubahan Pola Protein Mitokondria Hati Tikus yang diinduksi oleh t-BHP. *Tesis Magister*. Jakarta. Universitas Indonesia. 2000.
14. **Olafsdotter K, Reed Dj.** Retention of Oxidized Glutathione by Isolated Rat Liver Mitochondria During Hydroperoxide Treatment. *Biochem Biophys Acta*, 1988; 964: 377-82.
15. **Kunchandy E, Rao MNA.** Oxigen Radical Scavenging Activity of Curcumin, *International Journal of Pharmaceutics*, 1990; 58:237-40.
16. **Peraturan Pemerintah** No. 275/Menkes /SK/XI/1989

