

Penguraian Parasetamol oleh Sel dan Protein Ekstraselular Khamir *Candida tropicalis* dan *Rhodotorula minuta*

*Paracetamol Degradation by Cells and Extracellular Protein of Yeast of *Candida tropicalis* and *Rhodotorula minuta**

Heddy Julistiono*, Ernawati Saragih, dan Titin Yulineri

Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Jakarta – Bogor Km. 46 Cibinong Bogor, Jawa Barat Indonesia 16911

*Korespondensi Penulis: heddy_j@yahoo.com

Submitted: 23-11-2016, Revised: 28-07-2017, Accepted: 15-08-2017

<http://dx.doi.org/10.22435/mpk.v27i3.5749.169-174>

Abstrak

Khamir dapat digunakan sebagai sel model untuk mempelajari toksisitas pada sel mamalia. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa khamir *Candida tropicalis* mampu memetabolisme obat analgesik parasetamol dan mengakibatkan terjadinya cekaman oksidasi pada sel seperti yang terjadi pada sel mamalia. Pada sel mamalia, metabolisme parasetamol terutama dilakukan setidaknya oleh enzim membran sitokrom P450 dan peroksidase. Untuk mengetahui indikasi keterlibatan enzim peroksidase dalam metabolisme parasetamol pada *C. tropicalis* dan *Rhodotorula minuta*, diamati efek senyawa inhibitor peroksidase kalium sianida (KCN) terhadap metabolisme parasetamol; juga efek hidrogen peroksida (H_2O_2), senyawa substrat peroksidase. Hasil menunjukkan bahwa pada kedua khamir, baik pada sel maupun protein ekstraselular dapat mengurai parasetamol. Penguraian parasetamol dapat dihambat oleh KCN ($0,01 \mu M$) dan juga H_2O_2 ($3 \mu M$). Mengingat pada umumnya khamir memiliki P450 dalam sel (membran) tetapi tidak ada aktivitas P450 pada larutan ekstraselular, maka hasil ini mengindikasikan adanya peran enzim terlarut dalam mengurai parasetamol, yang dihambat oleh KCN dan H_2O_2 . Kemungkinan enzim terlarut tersebut adalah peroksida yang kemampuan metabolisme parasetamolnya dapat dihambat oleh H_2O_2 melalui proses kompetitif dan keracunan dibahas dalam penelitian ini. Kemampuan metabolisme parasetamol oleh enzim yang diduga peroksidase menambah peluang penggunaan khamir dalam penelitian toksisitas parasetamol di tingkat sel.

Kata kunci: *Candida tropicalis*, *Rhodotorula minuta*, parasetamol, sel model, peroksidase

Abstract

Yeast can be used as cell model to study toxicity in mammalian cell. In the previous study we demonstrated that yeast *Candida tropicalis* was able to metabolize analgesic drug paracetamol causing oxidative stress. This phenomenon is similar to that in mammalian cell. In mammalian cell system, enzymes responsible in paracetamol metabolism are at least cytochrome P450 (P450) and peroxidase. In order to understand the possible role of peroxidase enzyme in paracetamol metabolism in yeast, research on the effect of peroxidase inhibitor of sodium cyanide (KCN) and a peroxidase substrate peroxide (H_2O_2) on paracetamol degradation by cell suspension and extracellular protein of *C. tropicalis* and *Rhodotorula minuta* was carried out. Paracetamol was degraded by cells or extracellular protein in both of yeast. Paracetamol degradations were significantly inhibited by KCN ($0.01 \mu M$) or H_2O_2 ($3 \mu M$). Since P450 is generally located inside the cell (in cell membrane) while no activity of P450 in extracellular, the data indicated the presence of soluble enzyme which is able to metabolize paracetamol that is inhibited by KCN or H_2O_2 . The possibility of presence of peroxidase in the soluble protein by which paracetamol is metabolized and its inhibition by peroxide via competitive substrate or peroxide toxicity is discussed. The results supported use of yeast for studying toxicity of paracetamol in cell level.

Keywords: *Candida tropicalis*, *Rhodotorula minuta*, paracetamol, cell model, peroxidase

Pendahuluan

Parasetamol (*acetaminophen*, *N-acetyl-p-aminophenol*) merupakan salah satu senyawa analgesik dan antipiretik yang banyak digunakan. Pada kondisi tertentu, parasetamol bisa bersifat racun yang sampai sekarang masih jadi perhatian.¹ Keracunan pada sel mamalia bisa akibat teroksidasinya parasetamol menjadi *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI), suatu senyawa *intermediate* yang reaktif yang dikatalisis oleh enzim sitokrom P450 (P450). Senyawa ini mengakibatkan menurunnya glutathion yang pada proses selanjutnya akan mengakibatkan keracunan pada sel.² Pada sel mamalia, toksisitas parasetamol terjadi terutama melalui pembentukan metabolit radikal bebas hasil metabolisme oleh enzim sitokrom P450 dan peroksidase.^{3,4} P450 merupakan enzim yang terdapat pada membran sel, terutama pada retikulum endoplasma⁵ sedang peroksidase merupakan enzim yang larut pada sitosol dan sebagai ekskresi.⁶

Sel khamir dapat digunakan sebagai sel model untuk mengetahui sifat senyawa yang diduga dapat mengakibatkan stres oksidasi di tingkat sel untuk mempelajari proses di tingkat molekuler yang melatarbelakangi terjadinya bermacam kematian sel dari organisme tingkat tinggi seperti hewan dan manusia.^{7,8} Penggunaan sel khamir untuk kajian ini dapat berguna mengingat khamir mudah ditumbuhkan dan biaya penelitian relatif rendah. Pada khamir *C. tropicalis*, diketahui bahwa parasetamol dapat bersifat toksik yang mirip dengan yang terjadi pada sel mamalia.⁹ Namun enzim yang bertanggung jawab terhadap metabolisme parasetamol pada khamir uji ini belum diketahui. Menurut penelitian Srikanth *et al*,¹⁰ khamir *Saccharomyces cerevisiae* tidak menggunakan P450 untuk mengurai parasetamol. Pengetahuan tentang enzim pengurai parasetamol diperlukan sehingga penggunaan khamir untuk mempelajari toksisitas parasetamol serta penanggulangannya dapat diperoleh dengan akurasi yang lebih baik. Untuk mengetahui indikasi keterlibatan peroksidase khamir dalam metabolisme parasetamol, diamati kemampuan protein ekstraselular khamir (tanpa mengandung sel) dalam menurunkan kadar parasetamol, serta efek KCN atau H₂O₂ dalam menghambat kemampuan protein ekstraselular

dalam menurunkan kadar parasetamol. Hal ini dilakukan mengingat pada protein ekstraselular kecil kemungkinan adanya aktivitas P450, yang pada sel eukariot biasanya terletak pada membran retikulum endoplasma. Indikasi keterlibatan peroksidase dalam metabolisme parasetamol dapat diprediksi pertama dari terhambatnya kemampuan protein ekstraselular dalam menurunkan kadar parasetamol oleh KCN mengingat aktivitas enzim dihambat oleh KCN.¹¹ Indikasi keterlibatan peroksidase dalam metabolisme parasetamol didukung juga oleh terhambatnya kemampuan protein ekstraselular dalam menurunkan kadar parasetamol mengingat H₂O₂ adalah juga merupakan substrat bagi peroksidase.¹² Selain pada *C. tropicalis* pengamatan indikasi peran enzim P450 dan peroksidase dalam metabolisme parasetamol juga dilakukan pada khamir *R. minuta*. Mengingat *R. minuta* merupakan khamir yang mengandung karotenoid,¹³ maka potensinya sebagai sel model yang berkaitan dengan peran karotenoid sebagai pelindung terhadap senyawa radikal bebas akibat metabolisme parasetamol akan menarik. Pemahaman metabolisme parasetamol pada khamir ini diharapkan dapat mendukung penggunaan khamir untuk mempelajari kompleksitas toksisitas parasetamol di tingkat sel.

Metode

Biakan khamir yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida tropicalis* LIPIMC 0065 yang merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, diisolasi dari tanah di Cepu, Jawa Tengah yang terkontaminasi dengan limbah bahan bakar minyak.¹⁴ Khamir *Rhodotorula minuta* juga diperoleh dari LIPIMC. Parasetamol murni diperoleh dari Kimia Farma (Bandung Indonesia).

Media pertumbuhan khamir yang digunakan adalah media cair mengandung gliserol. Gliserol digunakan sebagai sumber karbon dan energi karena gliserol tidak terfermentasi oleh khamir yang menghasilkan etanol.⁹ Dengan demikian, selama pertumbuhan tidak terdapat etanol yang berpotensi memodulasi enzim sitokrom P450. Dalam 1 liter media cair gliserol mengandung 2,4 ml gliserol; 1,3 g KH₂PO₄; 0,15 g MgSO₄·7H₂O; 3,0 g ekstrak

khamir; 4,0 g baktipepton; dan 1 ml larutan X (5,0 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,0 g $MnSO_4$; 2,8 g $CuSO_4$; dan 250 ml akuades). Semua bahan dilarutkan, kemudian media dipindahkan sebanyak 100 ml ke dalam labu Erlenmeyer dan di media agar untuk menghitung viabilitas khamir.

Media agar yang digunakan untuk pertumbuhan khamir adalah sebagai berikut:⁹ dalam 1 l media mengandung 3,0 g ekstrak khamir, 5,0 g baktipepton, 20 g bakto agar, 10 g glukosa, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ dan akuades sampai volumenya 1 l. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C, 150 atm.

Khamir ditumbuhkan pada media cair gliserol pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Khamir yang akan diuji diperoleh dari biak berumur 2 hari, pada saat fase stasioner. Kepadatan sel khamir yang hidup dihitung dengan metoda *spread plate* pada media agar. Satuan jumlah sel yang hidup adalah CFU (*colony forming unit*) per ml.

Kadar parasetamol diukur dengan menggunakan HPLC Shimadzu, Jepang. Fase gerak adalah metanol-air (90:10), dengan kolom Shimadzu Shim-pack CLC-C₈, suhu 40°C, kecepatan alir 0,5 ml/menit, pada panjang gelombang 254 nm. Volume sampel yang diinjeksikan adalah 20 µl.

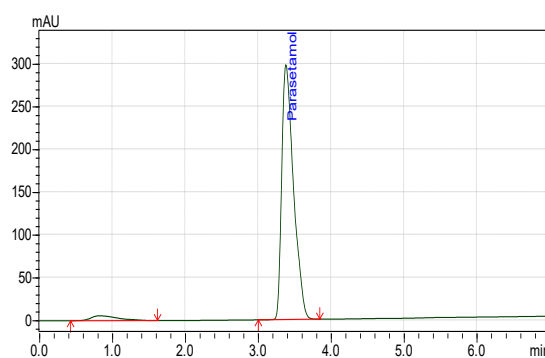
Untuk penyiapan suspensi sel untuk pengamatan metabolisme parasetamol, biakan dipanen pada fase stasioner. Dua tabung erlenmeyer berisi 100 ml biakan dicampur kemudian dilakukan sentrifugasi pada 5500 g selama 5 menit. Pelet dicuci dengan larutan penyangga fosfat pH 7. Setelah dilakukan sentrifugasi lagi, pelet ditambah larutan penyangga fosfat 0,05 M pH 7 sehingga volumenya menjadi 12,5 ml. Untuk mengamati metabolisme parasetamol pada suspensi sel, 600 µl suspensi ditambah larutan parasetamol (konsentrasi akhir 0,05 mg/ml), atau parasetamol dan KCN (0,01 µM), atau air. Suspensi yang telah diperlakukan kemudian diinkubasi pada suhu kamar pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kepadatan sel adalah 500×10^6 CFU/ml.

Setelah 1 jam, inkubasi dihentikan dengan menambahkan 10 µl *trichloroacetic acid* (TCA) 75% pada suspensi, kemudian diukur kandungan parasetamol pada saat 0 dan 1 jam inkubasi.

Protein ekstraselular sel untuk studi metabolisme parasetamol oleh enzim terlarut disiapkan dengan melalui tahapan yang sama seperti pada penyiapan suspensi sel. Setelah diperoleh suspensi sebanyak 0,5 ml, suspensi disentrifugasi pada 8000 g selama 5 menit. Supernatan diambil dengan tidak mengikutkan sel. Kandungan protein ekstraselular diukur dengan metode Bradford.¹⁵ Untuk mengamati metabolisme parasetamol protein ekstraselular, 600 µl larutan protein tersebut ditambah larutan parasetamol (konsentrasi akhir 0,01 mg/ml), atau parasetamol dan KCN (0,01 µM), atau parasetamol dan H_2O_2 (3 µM), atau air. Larutan protein yang telah diperlakukan kemudian diinkubasi pada suhu kamar pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Konsentrasi protein adalah 0,5 µg/ml. Setelah 1 jam, inkubasi dihentikan dengan menambahkan 10 µl *trichloroacetic acid* (TCA) 75% pada larutan tersebut, kemudian diukur kandungan parasetamol pada saat 0 dan 1 jam inkubasi.

Hasil

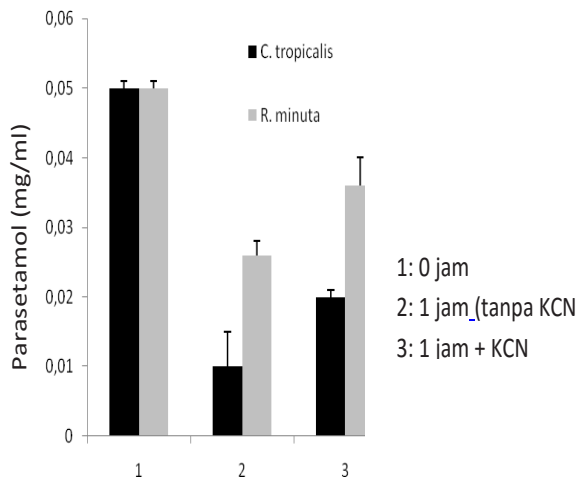
Pengukuran kandungan parasetamol pada sampel maupun larutan standar menggunakan HPLC pada kondisi penelitian ini menunjukkan akurasi yang cukup baik yang ditunjukkan adanya *peak* tunggal (Gambar 1).



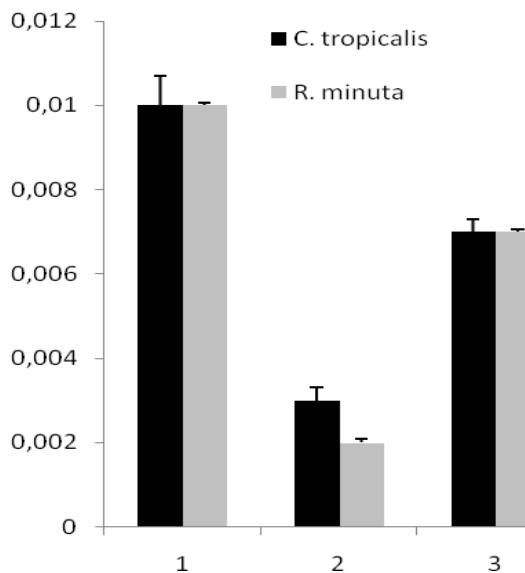
Gambar 1. Khromatogram HPLC Parasetamol

Pengaruh KCN terhadap Penurunan Kadar Parasetamol pada Suspensi sel setelah Diinkubasi Selama 1 Jam.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa baik pada *C. tropicalis* maupun *R. minuta*, kadar parasetamol pada suspensi sel menurun setelah 1 jam inkubasi.



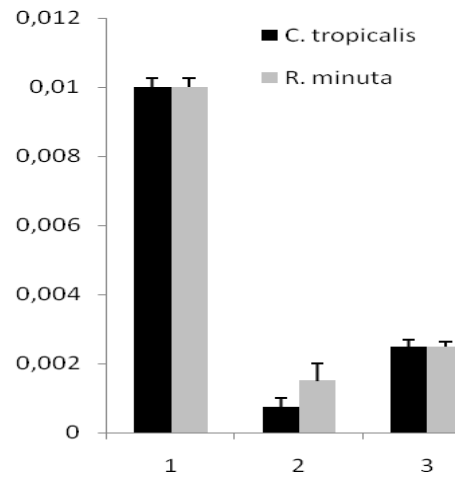
Gambar 2. Kadar Parasetamol dalam Suspensi Sel *C. tropicalis* dan *R. minuta* Setelah Diinkubasi selama 1 Jam, tanpa, dan dengan Penambahan KCN



Gambar 3. Kadar Parasetamol dalam Larutan Ekstraselular *C. tropicalis* dan *R. minuta* Setelah Diinkubasi Selama 1 jam, tanpa, dan dengan Penambahan KCN

Pengaruh KCN terhadap Penurunan Kadar Parasetamol pada Protein Ekstraselular Setelah Diinkubasi Selama 1 jam.

Seperti yang tersaji pada Gambar 3, kadar parasetamol yang terdapat pada protein ekstraselular dari khamir *C. tropicalis* dan *R. minuta* mengalami penurunan setelah 1 jam inkubasi. Penurunan kadar parasetamol ini terhambat oleh keberadaan KCN.



Gambar 4. Kadar Parasetamol dalam Larutan Ekstraselular *C. tropicalis* dan *R. minuta* setelah Diinkubasi Selama 1 jam, tanpa, dan dengan Penambahan H₂O₂

Pengaruh H₂O₂ terhadap Penurunan Kadar Parasetamol pada Protein Ekstraselular Setelah Diinkubasi selama 1 jam.

Pengaruh H₂O₂ terhadap penurunan kadar parasetamol pada protein ekstraselular dari *C. tropicalis* dan *R. minuta* disajikan pada Gambar 4. Pada Gambar 4 terlihat bahwa kemampuan larutan protein ekstraselular untuk memetabolisme parasetamol dihambat oleh H₂O₂

Pembahasan

Data ini (Gambar 2 dan 3) menunjukkan bahwa kedua khamir mampu melakukan metabolisme parasetamol. Pada suspensi sel ini, karena enzim bisa berasal dari dalam sel seperti P450, atau terlarut dalam sitosol yang bisa keluar sel, maka enzim yang bertanggung jawab terhadap metabolisme parasetamol ini bisa berasal dari keduanya. Pada suspensi sel yang mengandung KCN, kadar parasetamol lebih tinggi daripada suspensi sel yang tidak diperlakukan dengan KCN. Hal ini menunjukkan adanya penghambatan enzim oleh KCN sehingga metabolisme parasetamol terhambat. P450 adalah enzim yang aktivitasnya dapat dihambat oleh KCN⁵ demikian juga peroksidase.¹¹

Larutan ekstraselular kedua khamir mampu melakukan metabolisme parasetamol; metabolisme dihambat oleh KCN (Gambar 3). Aktivitas P450 tidak dimungkinkan pada larutan ekstraselular mengingat enzim ini menjadi bagian dari membran sel dan aktivitasnya tergantung enzim-enzim pendonor

elektron dalam sistem yang utuh.⁵ Dengan demikian, peran peroksidase pada metabolisme parasetamol dalam larutan protein ekstraselular ini lebih dimungkinkan daripada P450. Adanya penghambatan metabolisme parasetamol oleh H₂O₂ (Gambar 4) memperkuat indikasi bahwa enzim peroksidase kedua khamir bertanggung jawab terhadap metabolisme parasetamol. Data ini konsisten dengan penelitian Koelsch *et al.*,¹² yakni bahwa peroksidase (*mieloperoxidase*, MPO) diketahui bertanggung jawab terhadap metabolisme parasetamol; sedang parasetamol dan H₂O₂ merupakan substrat kompetitif bagi MPO. González-Sánchez *et al.*⁴ juga melaporkan bahwa “*peroxidase-like*” dari *methaemoglobin* dapat melakukan metabolisme parasetamol dengan H₂O₂ sebagai substrat kompetitifnya. Terhambatnya penguraian parasetamol oleh keberadaan H₂O₂ juga dapat dimungkinkan oleh toksisitas H₂O₂ yang berlebihan sehingga timbul radikal bebas seperti yang ditunjukkan oleh Galende *et al.*¹⁶ pada tanaman *Cytisus multiflorus*.

Secara keseluruhan, hasil penelitian mengindikasikan bahwa enzim peroksidase pada kedua khamir berpotensi sebagai enzim yang bertanggung jawab dalam proses metabolisme parasetamol. Hal ini didukung juga oleh adanya aktivitas peroksidase larutan ekstra selular kedua khamir yang terdeteksi dengan munculnya gelembung ketika larutan ditambah dengan H₂O₂ (data tidak ditampilkan). Namun sifat racun dari metabolit yang terbentuk masih perlu dikaji lebih jauh. Pada umumnya, pada sel mamalia, senyawa asing dapat dimetabolisasi oleh enzim peroksidase sehingga menghasilkan metabolit radikal bebas penyebab kerusakan sel.¹⁷

Kesimpulan

Enzim peroksidase memiliki peran dalam metabolisme parasetamol pada khamir *C. tropicalis* dan *R. minuta* sehingga kedua khamir tersebut dapat berpotensi sebagai sel model yang murah dalam penapisan senyawa yang memiliki aktivitas melindungi sel yang terpapar parasetamol.

Saran

Isolasi dan karakterisasi enzim peroksidase dari kedua khamir ini serta pengukuran radikal bebas yang berhubungan dengan metabolisme parasetamol diharapkan dapat memperjelas mekanisme keracunan sel akibat paparan parasetamol.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi – LIPI. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Suri Handayani atas bantuan teknis dalam pengukuran parasetamol menggunakan HPLC.

Daftar Pustaka

1. Gupte GL. Management of paracetamol overdose. *J Paediatric Child Health*. 2016;26:459-63.
2. Klopčič I, Poberžnik M, Mavri J, Dolenc MS. A quantum chemical study of the reactivity of acetaminophen (paracetamol) toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine with deoxyguanosine and glutathione. *Chem Biol Interac*. 2015; 242:407-14.
3. Nelson SD. 1982. Metabolic activation and drug toxicity. *J Med Chem*. 1982;25:753-65.
4. González-Sánchez MI, Manjabacas MC, García-Carmona F, Valero E. Mechanism of acetaminophen oxidation by the peroxidase-like activity of methemoglobin. *Chem Res Toxicol*. 2009 ;22:1841-50.
5. Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent structural insights into Cytochrome P450 function. *Trend Pharmacol Sci*. 2016;37:625-40.
6. Panagopoulos V, Liapis V, Zinonos I, Hay S, Damien Leach DA, Ingman W, et al. Peroxidase enzymes inhibit osteoclast differentiation and bone resorption. *Mol Cell Endocrin*. 2017;440:8-15.
7. Rego A, Trindade D, Chaves SR, Manon S, Costa V, Sousa MJ et al. The yeast model system as a tool towards the understanding of apoptosis regulation by sphingolipids. *FEMS Yeast Res*. 2014;14:160–78.
8. Kanprasoet W, Jensen LT, Sriprach S, Thititanpakorn K, Rattanapornsompong K, Jensen AN. Deletion of mitochondrial porin alleviates stress sensitivity in the yeast model of shwachman-Diamond syndrome. *J Genet Genomics*. 2015;42:671-84.
9. Julistiono H. Toksisitas asetaminofen pada khamir *Candida tropicalis*. *Berkala Penelitian Hayati*. 2012;17:53-6.
10. Srikanth CV, Chakraborti AK, Bachhawat AK. Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 2005;151:99–111.
11. Zeng W, Sun Y, Benabbas A, Champion PM. Investigations of ferric heme cyanide photodissociation in myoglobin and horseradish peroxidase. *J Phys Chem B*. 2013;117:4042–49.

12. Koelsch M, Mallaka R, Grahamb GG, Kajer T, Milligan MK, Nguyen LQ, et al. Acetaminophen (paracetamol) inhibits myeloperoxidase-catalyzed oxidant production and biological damage at therapeutically achievable concentrations. *Biochem Pharmacol.* 2010;79:1156–64.
13. Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb Cell Fact.* 2014;13:12.
14. Saono S, Gandjar I. Hydrocarbon-utilizing soil yeasts from oil fields in Tjepu region (central java), Indonesia. *Annales Bogorienses.* 1974;V:123-9.
15. Bradford MA. Rapid & sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-2.
16. Galende PP, Cuadrado NH, Kostetsky EY, Roig MG, Kennedy JF, Shnyrov VL. Mechanism-based suicide inactivation of white Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase by excess hydrogen peroxidase. *Int J Biol Macromolec.* 2015;81:975-9.
17. MacAllister SL, Maruf AA, Wan L, Chung E, O'Brien P. Modeling xenobiotic susceptibility to hepatotoxicity using an in vitro oxidative stress inflammation model. *CanJ Physiol Pharmacol.* 2013;91:236-40.