

Efek Kurkumin terhadap Aktivitas Enzim Glutathion Peroksidase Mitokondria Hati Tikus

SYAMSUDIN^{1*}, SUYATNA FD², GANISWARNA S², SADIKIN M³

¹Bagian Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila,
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

²Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

³Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

Diterima 19 April 2004, Disetujui 22 Juni 2004

Abstract: This study was conducted to prove the hypothesis that Curcumin could prevent the oxidative damage of rat liver mitochondria induced by t-butylhydroperoxide (t-BHP). The induction of 400 μ M t-BHP reduced Glutathione Peroxidase (GPx) activity from (0.29 \pm 0.03) to (0.04 \pm 0.01) μ mol/min/mg protein. Instillation of Curcumin of 1000 μ M could elevate GPx activity to (0.16 \pm 0.002) μ mol/min/mg protein.

Key words: glutathione peroxidase, t-BHP, Curcumin, mitochondria

PENDAHULUAN

Kurkumin merupakan zat warna kuning yang terdapat di dalam berbagai spesies kurkuma seperti *Curcuma longa* L., *Curcuma xanthorrhizae* Roxb. dan berbagai spesies lainnya. Zat tersebut banyak digunakan dalam pengobatan tradisional untuk penyakit hati. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kurkumin dapat mencegah kerusakan hati yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄), galaktosamin⁽¹⁾ dan parasetamol dosis tinggi⁽²⁾. Aktivitas antioksidan dari kurkumin nampaknya memegang peranan penting dalam kemampuannya sebagai hepatoprotektor⁽³⁾.

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, ditemukan bahwa radikal bebas memegang peranan penting dalam patofisiologi berbagai penyakit. Peran radikal bebas dalam patofisiologi penyakit seperti pada penyakit hati, iskemia dan kanker telah banyak dipelajari. Selain itu radikal bebas juga diketahui sebagai salah satu penyebab kerusakan dan kematian sel^(3,4,5).

Beberapa penelitian^(3,6) memperlihatkan bahwa kerusakan mitokondria berperan penting pada kerusakan dan kematian sel. Hal ini disebabkan karena mitokondria memainkan peranan penting dalam pernafasan sel. Dalam keadaan fisiologis,

mitokondria memiliki mekanisme pertahanan yang dapat menetralkan radikal bebas antara lain enzim glutathion peroksidase (GPx).

Pada penelitian ini ingin dilihat kerja kurkumin pada mitokondria. Mitokondria diisolasi dari hati tikus, sedangkan sebagai model kerusakan digunakan oksidan t-BHP yang dapat menghasilkan radikal bebas. Efek proteksi kurkumin terhadap mitokondria dinilai dari peningkatan aktivitas enzim anti oksidan yaitu: glutathion peroksidase.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan adalah standar Kurkumin (Sigma C 1386), sukrosa, ethylene glycol bis (β -aminoethyleter)-N,N',N''-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma E 3889), Tris HCl (Sigma T6666), bovine serum albumin (BSA) (Sigma A 2153), butilhidroperoksida tersier (t-BHP) (Sigma B 2633), kalium sianida, natrium suksinat, glutathion, natrium azida, natrium fosfat, NADPH, 2,6-diklorofenol indofenol.

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-visibel Lambda 3P-Perkin Elmer.

METODE. Tikus didekapitasi, kemudian diambil hatinya dan dilakukan isolasi mitokondria. Untuk

* Penulis korespondensi, telp. (021) 7864727,
e-mail: syamsudin_27@yahoo.com

mengetahui tingkat kemurnian fraksi mitokondria yang diperoleh, dilakukan pengukuran kadar protein pada fraksi homogenat 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 5 μM (IDK_{5}), kelompok kurkumin dosis 1000 μM (IDK_{1000}) dan kelompok kurkumin dosis 5000 μM (IDK_{5000}).

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 10.000g 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⁽⁷⁾.

Pengukuran aktivitas enzim suksinat dehidrogenase (SDH). Sampel diencerkan dalam medium SET-34 tanpa BSA sampai diperoleh pengenceran yang sesuai (5,3-7,2 mg protein/ml). Empat puluh μl sampel ditambahkan 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. Serapan diukur pada λ 600 nm pada suhu 37°C selama 3 menit⁽¹⁴⁾.

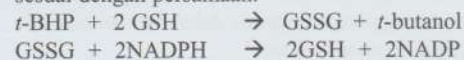
Pengukuran aktivitas enzim glutation peroksidase (GPx). Sepuluh μl sampel mitokondria ditambahkan pada campuran yang terdiri atas 200 μl glutation (GSH) 20 mM, 200 μl natrium azida 20 mM, 200 μl EDTA 20 mM, 200 μl *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) 1 mM, 30 μl glutation reduktase 1 UI, 90 μl larutan

dapar fosfat pH 7,0 0,1M. Inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya serapan dibaca pada λ 340 nm selama 5 menit pada suhu 37°C⁽⁸⁾.

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 kelompok 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 penanda 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. melaporkan untuk mengetahui tingkat kemurnian dari mitokondria yang diisolasi yaitu dengan mengukur enzim petanda dari fraksi mitokondria⁽¹⁵⁾. Pada umumnya nilai pengayaan berbagai enzim petanda dalam fraksi mitokondria sekurang-kurangnya 2,5. Di sini terlihat bahwa SDH merupakan enzim penanda mitokondria yang terdapat dalam jumlah besar dibandingkan dalam fraksi homogenat, dengan demikian fraksi mitokondria yang diperoleh cukup murni. Aktivitas GPx naik 90% setelah pemberian *t*-BHP dosis 100 μM , sedangkan dosis 200 μM mengalami kenaikan 19% (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa *t*-BHP meningkatkan produksi glutation bentuk teroksidasi (GSSG) sehingga perlu direduksi menjadi glutation (GSH) oleh glutation reduktase sesuai dengan persamaan:

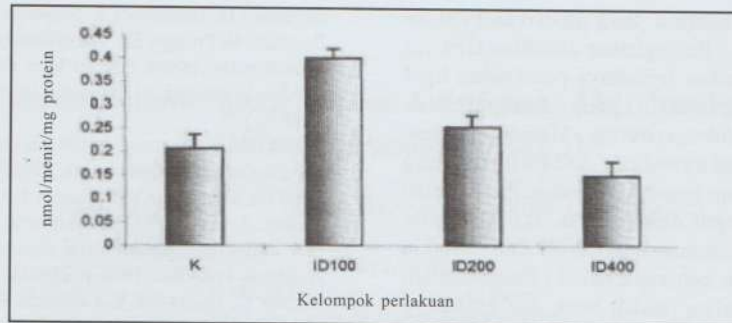


Marinho dkk. melakukan penelitian mengenai pengaruh GPx dalam mereduksi lisofosfolipid hidroperoksida membran mitokondria⁽⁹⁾. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan aktivitas

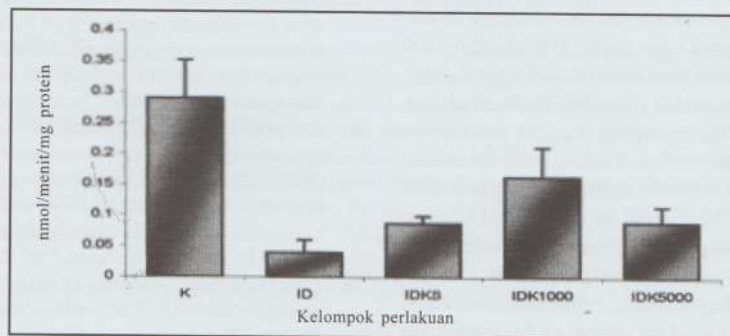
Tabel 1. *Specific activity* (SA) dan *relative specific activity* (RSA) enzim suksinat dehidrogenase (SDH) pada masing-masing fraksi

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

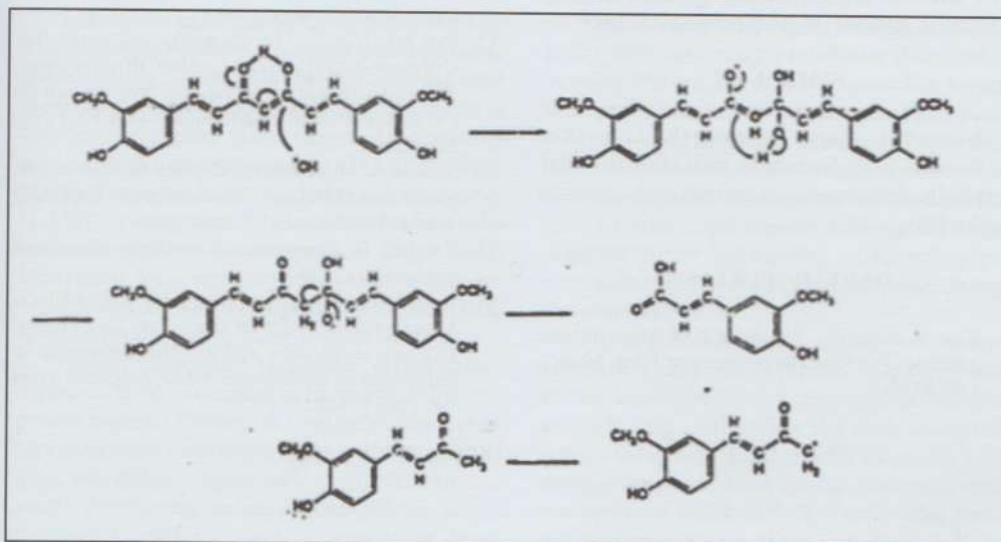
Keterangan: SA: satuan nmol/menit/mg protein; RSA: (% dari SA) enzim penanda pada fraksi homogenat total dibagi dengan % dari protein pada suatu fraksi terhadap protein total.



Gambar 1. Efek *t*-BHP dalam berbagai konsentrasi terhadap aktivitas glutation peroksidase. K: kelompok kontrol, ID100: kelompok perlakuan dengan *t*-BHP 100 μM, ID200: kelompok perlakuan dengan *t*-BHP 200μM, ID400: kelompok perlakuan dengan *t*-BHP 400 μM.



Gambar 2. Aktivitas enzim glutation peroksidase mitokondria hati tikus pada semua kelompok.



Gambar 3. Reaksi penangkapan radikal hidroksil oleh kurkumin⁽¹²⁾.

GPx pada mitokondria yang diberikan kumene hidroperoksida. Peningkatan aktivitas GPx ini mungkin disebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran mitokondria yang menghasilkan lisofosfolipid hidroperoksida. Membran dalam mitokondria mengandung kardioprotein yang mengandung asam lemak tidak jenuh. Peningkatan dosis *t*-BHP dapat menurunkan aktivitas GPx (Gambar 1). Penurunan aktivitas GPx ini mungkin disebabkan oleh beberapa hal: 1) Pembentukan radikal bebas dalam jumlah besar dan terjadinya peroksidasi lipid⁽¹⁰⁾. 2) Inaktivasi protein enzim karena mitokondria mengalami deplesi glutation yang disertai akumulasi GSSG⁽⁴⁾. Mengingat sudah dilakukan penelitian secara *in vitro* dengan menggunakan mitokondria yang terisolasi⁽¹¹⁾, maka kemungkinan pertama dapat disingkirkan. Pemberian kurkumin pada dosis 1000 μ M dan 5000 μ M dapat meningkatkan aktivitas GPx yang telah diinduksi dengan *t*-BHP (Gambar 2). Peningkatan aktivitas GPx ini mungkin karena kurkumin menetralkan radikal bebas. Reaksi radikal hidroksil (OH•) dengan kurkumin menyebabkan hidrogen fenolik ditarik, kemudian radikal fenoksi yang dihasilkan dimantapkan oleh resonansi dan bereaksi kembali dengan radikal fenoksi tersebut. Dengan cara ini OH• dinetralkan, sehingga mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada membran mitokondria. Kemudian kurkumin akan terurai membentuk asam ferulat dan fenilbutanon (Gambar 3)⁽¹²⁾. Glutathione peroksidase berperan di dalam sistem pertahanan intra sel terhadap peroksidasi lipid⁽¹³⁾.

SIMPULAN

Kurkumin dapat mencegah kerusakan mitokondria yang disebabkan oleh oksidan *t*-BHP yang dinilai dari peningkatan aktivitas enzim glutathione peroksidase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N. Antihepatotoxic principle of *Curcuma longa* rhizomes. *Planta Medica*. 1983;49:85.
2. Suyatna FD, Ganiswara S, Siswoyo K, Asikin N, Rosmiati H, Pringgo U. The effects of the curcuma against paracetamol-induced liver damage in rats. *Medical Journal of University of Indonesia*. 1992;1(1):20.
3. Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;(1271):1-6.
4. Reed DJ, Gogvadze V, Laffanchi R Jones D, Lash, editors. Assesment of glutathione as a measure of cell injury in mitochondrial dysfunction. USA: Academic Press Inc.; 1993. p. 219-225.
5. Richter C, Gogvadze V, Laffanchi R. Oxidants in mitochondrial from physiology to disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;(1272):67.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rded. Oxford: Oxford University Press; 1998. p. 22-24.
7. Toward NR, Dixon H, Kellerman GM. Biogenesis of mitochondrial, the sensitive of rat liver mitochondria to antibiotics: a phylogenetic difference between a mammalian system and yeast. *Arch Biochem Biophys*. 1972;151:361.
8. Cohen G, Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 1963;(2):1420.
9. Marinho, Antunes, Pinto R. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(5):888.
10. Fuller G, Shields D. *Molecular basis of medical cell biology*. 1sted. USA: Prentice Hall International Inc; 1998. p. 100.
11. Djohan R. Efek kurkumin terhadap kerusakan mitokondria hati tikus yang ditimbulkan oleh butilhidroperoksida tersier [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 1999.
12. Van der Goot H. The chemistry and qualitative structure-activity relationship of curcumin. Disampaikan pada International Symposium on Curcumin Pharmacology (ISCP) 1995. Yogyakarta.
13. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;22.
14. Rendina G. Experimental methods in modern biochemistry. p. 284
15. Lash LH, Sall J, Jones D, Lash LH, editors. Mitochondrial isolation from liver and kidney, strategy techniques and criteria for purity in mitochondrial dysfunction. USA: Academic Press Inc; 1993. p. 8-21.