

LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA



**DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.)
TERHADAP AKTIVITAS GLUTATION S-TRANSFERASE PARU TIKUS
SECARA *IN VITRO***

Oleh:

Wahyu Utami, M.Si.,Apt

Andi Suhendi, S.Farm.,Apt

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian
Nomor: 156/SP2H/PP/DP2M/III/2008, tanggal 29 Maret 2007**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
BULAN SEPTEMBER, TAHUN 2008**

HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. Judul Penelitian : Daya Hambat Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) terhadap Aktivitas Glutation S-Transferase Paru Tikus secara *in Vitro*
2. Bidang Ilmu Penelitian : MIPA/Farmasi
3. Ketua Peneliti
 - a. Nama lengkap : Wahyu Utami, S.Si., M.Si., Apt
 - b. Jenis Kelamin : P
 - c. NIK : 875
 - d. Pangkat/Golongan : Penata Muda / IIIa
 - e. Jabatan : Asisten Ahli
 - f. Jabatan Struktural : Dosen
 - g. Fakultas/Jurusan : Farmasi
4. Jumlah Tim Peneliti : 1 Orang
5. Lokasi Penelitian : Lab. Ilmu Hayati UGM
Lab. Kimia Instrumen Farmasi UMS
6. Waktu Penelitian : 8 bulan
7. Biaya : Rp. 10.000.000,00

Surakarta, September 2008
Ketua Peneliti,

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi

Dra. Nurul Mutmainah, M.Si.,Apt
NIK. 831

Wahyu Utami, S.Si.,M.Si.,Apt
NIK. 875

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Muhammadiyah Surakarta

Prof. Dr. Markhamah, M.Hum
NIP. 131683025

RINGKASAN

Glutation S-Transferase (GST) merupakan suatu famili enzim multifungsional yang mengkatalisis konjugasi antara glutation (GSH) dengan senyawa xenobiotik elektrofilik (Hsieh dkk., 1999). Pada mamalia, GST dapat digolongkan menjadi 7 kelas isoenzim yang berbeda, yakni kelas *alpha*, *mu*, *pi* (Mannervik & Danielson, 1988), *sigma* (Meyer & Thomas, 1995), *theta* (Meyer dkk., 1991), *zeta* (Board dkk., 1997), *Omega* (Board dkk., 2000).

Pada penyakit kanker sering menunjukkan aktivitas GST berlebihan. sehingga terapi kanker dengan obat sitostatik, yang bersifat elektrofilik, umumnya akan mengalami resistensi karena sebagian besar obat sitostatik justru dimetabolisme melalui konjugasi dengan GSH yang dikatalisis oleh GST. Sebagai akibatnya terjadilah penurunan efektivitas obat sitostatik tersebut. Namun apabila obat sitostatik tersebut diberikan bersama obat lain yang bersifat sebagai inhibitor GST yang selektif, maka efektivitas obat sitostatik tersebut akan meningkat.

Pada penelitian terdahulu, senyawa fenol dalam tanaman, termasuk flavonoid, dilaporkan sebagai inhibitor *in vitro* terhadap GST dengan substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Das dkk, 1984 ; Iio dkk, 1993).

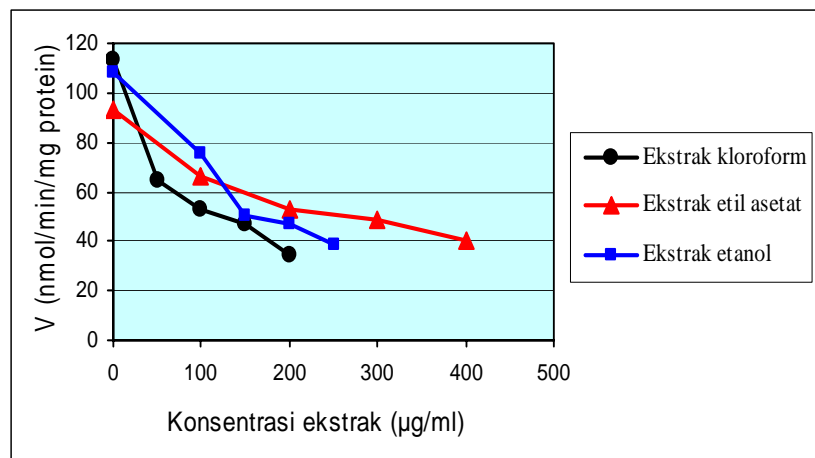
Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) adalah tanaman yang hidup tersebar di pulau Jawa dan Sumatera (Hutapea, 1991). Dewandaru mengandung senyawa seperti sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tanin dan antosianin (Einbond, *et al.*, 2004). Penelitian terkait yang pernah dilakukan melaporkan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun Dewandaru mampu menghambat aktivitas GST ginjal tikus dengan substrat CDNB dimana nilai IC_{50} -nya berturut-turut untuk ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol adalah 376,26; 228,96; dan 180,05 $\mu\text{g/ml}$ (Utami, 2007).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun dewandaru terhadap aktivitas GST paru tikus secara *in vitro* dengan substrat CDNB sebagai substrat kelas GST umum.

Penelitian dilakukan dengan fraksi sitosol paru tikus sebagai sumber GST yang disiapkan dengan metode Lundgren dkk (1987). Ekstrak kloroform, etil

asetat dan etanol daun dewandaru diperoleh dengan cara maserasi bertingkat.. Kadar protein fraksi sitosol ditentukan dengan metode Lowry (1951) dengan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar. Aktivitas GST diukur dari kecepatan pembentukan produk konjugat GSH dan substrat, secara spektrofotometri (Habig dkk,1974). Diperoleh hasil berupa aktivitas GST dengan dan tanpa ekstrak sehingga dapat dihitung % inhibisi ekstrak terhadap aktivitas GST. Kemudian dari persamaan garis regresi antara log konsentrasi ekstrak dengan % inhibisi yang dihasilkan. ditentukan IC_{50} masing-masing ekstrak, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas GST sebesar 50%.

Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas GST paru tikus dengan penambahan ekstrak daun dewandaru (Gambar 1).



Gambar 1. Daya Hambat Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Aktivitas GST Paru Tikus dengan Substrat CDNB.

Pada penelitian didapatkan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru mampu menghambat GST. Ekstrak kloroform mempunyai nilai IC_{50} yang paling kecil, ini menunjukkan bahwa potensinya penghambatannya besar. Ekstrak kloroform mempunyai potensi penghambatan yang paling besar jika dibandingkan dengan ekstrak etil asetat maupun ekstrak etanol yaitu dengan nilai IC_{50} 77,964 µg/ml diikuti dengan ekstrak etanol (160,0135 µg/ml) dan ekstrak etil asetat (299,305 µg/ml) (Tabel 1). Menurut Iio dkk., (1993) senyawa flavonoid terbukti mampu menghambat aktivitas GST pada liver tikus secara *in vitro* dengan substrat CDNB, senyawa flavonoid ini menghambat aktivitas GST

secara kompetitif melalui ikatan pada sisi nukleofilik GST yang menyebabkan tidak terbentuknya konjugat GS-DNB.

Tabel 1. Penetapan Nilai IC₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru

Ekstrak	Kadar protein (mg/ml)	Kadar ekstrak (µg/ml)	Rate (abs/min)	V (nmol/min/mg protein)	% inhibisi	IC ₅₀ (µg/ml)
Etanol	12,87	0	0,178	108,05	-	160,014
		100	0,125	75,88	30,14	
		150	0,083	50,38	53,57	
		200	0,077	46,74	56,92	
		250	0,064	38,85	64,19	
Etil asetat	12,87	0	0,154	93,48	-	299,305
		100	0,109	66,17	29,22	
		200	0,087	52,81	43,51	
		300	0,080	48,56	48,05	
		400	0,067	40,67	56,49	
Kloroform	12,87	0	0,187	113,52	-	77,964
		50	0,106	64,35	43,31	
		100	0,087	52,81	53,48	
		150	0,078	47,35	58,29	
		200	0,057	34,60	69,52	

Pada tabel 1 terlihat bahwa terdapat perbedaan nilai penghambatan. Perbedaan nilai penghambatan oleh masing-masing ekstrak ini kemungkinan karena perbedaan struktur dan kandungan senyawa fenolik maupun flavonoid yang ada pada masing-masing ekstrak tersebut

Adanya perbedaan daya hambat yang dimiliki, disebabkan karena kandungan senyawa aktif yang berbeda pada masing-masing ekstrak. Meskipun telah dilaporkan bahwa senyawa aktif yang berperan adalah flavonoid (Das dkk., 1984), maka perbedaan aktivitas ini juga kemungkinan disebabkan kandungan jenis flavonoid yang berbeda pada masing-masing ekstrak. Sehingga dapat memberikan aktivitas yang berbeda pula.

Lebih lanjut dari hasil penelitian ini, dapat dimungkinkan bahwa ekstrak daun dewandaru dapat bermanfaat untuk meningkatkan efektivitas obat sitostatik pada terapi kanker.

ABSTRACT

Objective: In some tumor cases, the Glutathione S-Transferase (GST) have been known increased. It causes anticancer drugs would be metabolized faster. Dewandaru leaves extracts were shown inhibitory effect on GST rat liver activity. This research aims are to determine the inhibitory potency of chloroform, ethyl acetate, and ethanol extract of Dewandaru leaves on GST activity of rat pulmo by in vitro using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate.

Methods: The research was performed by using cytosolic fraction of rat pulmo which is prepared by centrifugation. Chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts of Dewandaru leaves were obtained by maceration. The protein content of cytosolic fraction was measured by Lowry method using bovine serum albumin (BSA) as standard. The GST activity was known from the conjugated product between Glutathione (GSH) and the substrate. It was measured by spectrophotometer. IC_{50} of each extract was determined from the plots of remaining activities versus the (varied) concentration of extract at a fixed concentration of substrate.

Results: The research results showed all extracts have inhibitory effect on GST activity. IC_{50} values of chloroform, ethyl acetate, and ethanol extract using CDNB as a substrate are 77.964; 299.305; 160.014 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Conclusions: Dewandaru leaves extracts were shown inhibitory effect on GST rat pulmo activity by in vitro using CDNB as substrate.

Key words: Glutathione (GSH), Glutathione S-Transferase (GST), Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, segala puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan rizqi yang diberikan sehingga penelitian dengan judul "DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) TERHADAP AKTIVITAS GLUTATION S-TRANSFERASE PARU TIKUS SECARA *IN VITRO*" ini dapat diselesaikan.

Penelitian yang dikerjakan ini merupakan sedikit upaya untuk menemukan senyawa inhibitor glutation S- transferase yang diharapkan dapat sebagai sebagai kombinasi dengan obat sitostatik yang bersifat elektrofil dalam terapi kanker untuk meningkatkan efektivitas terapi

Selesainya penelitian ini tidak terlepas dari dukungan dan bimbingan berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana penelitian.
2. Rektor dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
3. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Muhammadiyah Surakarta.
4. Agus yang telah membantu dalam penelitian ini..
5. Staf dan karyawan Instrumen Fakultas Farmasi UGM, Laboratorium Ilmu Hayati UGM dan Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM.
6. Berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT membalas segala amal dan kebaikannya.

Akhir kata penulis berharap penelitian ini dapat memberi manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Penulis menyadari penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan untuk perbaikan penelitian selanjutnya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Surakarta, September 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
ABSTRACT.....	vi
PRAKATA.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
1. Glutation	3
(GSH).....	
2. Glutation S-Transferase	4
3. GST dan resistensi obat antikanker.....	5
4. Manipulasi GST pada sel tumor.....	6
5. Senyawa 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB).....	6
6. Tanaman Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> Linn.).....	6
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
1 . Tujuan Penelitian.....	9
2. Manfaat Penelitian.....	9
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	10
1. Rancangan Penelitian.....	10
2. Variabel Penelitian.....	10
3. Bahan dan Alat	10
4. Jalannya Penelitian.....	11
a. Penyiapan simplisia daun dewandaru.	11
b. Pembuatan ekstrak daun dewandaru	11

c. Penyiapan fraksi sitosol paru tikus.....	11
d. Penetapan Kadar Protein Fraksi Sitosol <i>Liver</i> Tikus	12
e. Penentuan Aktivitas GST <i>Liver</i> Tikus.....	13
f. Penentuan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru	14
5. Cara Analisis.....	14
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
1. Perolehan Ekstrak Daun Dewandaru.....	15
2. Penyiapan Fraksi Sitosol <i>Liver</i> Tikus.....	16
3. Penetapan Kadar Fraksi Sitosol.....	18
4. Penentuan Aktivitas GST <i>Liver</i> Tikus.....	19
5. Penentuan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru.....	20
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
A. Kesimpulan.....	27
B. Saran.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Berat dan Rendemen Hasil Ekstraksi	17
Tabel 2. Hasil Penentuan Kadar Protein dalam Fraksi Sitosol GST Tikus.....	18
Tabel 3. Nilai % Inhibisi dan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru pada Konjugasi GSH – CDNB dengan Katalis GST <i>Liver</i> Tikus.....	22
Tabel 4. Nilai % Inhibisi dan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru pada Konjugasi GSH – DCNB dengan Katalis GST <i>Liver</i> Tikus.....	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur Glutation (GSH)	3
Gambar 2. Struktur Senyawa 1-kloro-2,4- dinitrobenzen(CDNB).....	7
Gambar 3. Reaksi Konjugasi GSH dengan Substrat CDNB.....	7
Gambar 4. Struktur Senyawa 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB).....	8
Gambar 5. Reaksi Konjugasi GSH dengan Substrat DCNB.....	8
Gambar 6. Skema Ekstraksi Daun Dewandaru.....	13
Gambar 7. Pengaruh Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Aktivitas GST dengan Substrat CDNB	21
Gambar 8. Pengaruh Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Aktivitas GST dengan Substrat DCNB	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Gambar Tanaman Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.).....	31
Lampiran 2. Data Perhitungan Rendemen.....	32
Lampiran 3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ maks) & <i>Operating Time</i> BSA.....	33
Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas GST Fraksi Sitosol <i>Liver</i> Tikus.....	34
Lampiran 5. Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru dengan Substrat CDNB.....	35
Lampiran 6. Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru dengan Substrat DCNB.....	37