

**DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN DEWANDARU
(*Eugenia uniflora* L.) TERHADAP AKTIVITAS GST
KELAS PI GINJAL TIKUS SECARA *IN VITRO***

**INHIBITORY POTENCY OF EXTRACT OF DEWANDARU
(*Eugenia uniflora* L.) ON THE PI CLASS
OF RAT'S RENAL GST ACTIVITY IN VITRO**

Wahyu Utami

Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A.Yani Tromol Pos 1 Pabelan, Surakarta 57102
Telp. (0271) 717417, Fax. (0271) 715448

ABSTRAK

Ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) telah dilaporkan mampu menghambat aktivitas glutathione *S*-transferase (GST) kelas umum (*a*, *i*, dan *δ*) dari hati dan ginjal tikus, namun belum diketahui pasti GST kelas *a*, *i*, atau *δ* yang dihambat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi hambatan ekstrak daun dewandaru terhadap aktivitas GST kelas *δ* (*pi*) ginjal tikus. Ekstrak daun dewandaru diperoleh dari maserasi secara bertingkat menggunakan kloroform, etil asetat dan etanol sehingga diperoleh ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol daun dewandaru. Untuk merepresentasikan aktivitas GST kelas *pi* digunakan substrat spesifik untuk GST kelas *pi* yaitu asam etakrinat (AE). GST dalam fraksi sitosol ginjal tikus disiapkan dengan metode sentrifugasi. Penentuan kadar protein dalam fraksi sitosol menurut metode Lowry dengan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar baku. Kemudian dilakukan penentuan aktivitas GST pada reaksi antara GSH dengan AE, secara spektrofotometri menurut metode Habig dkk (1974). Uji penghambatan dilakukan dengan penambahan ekstrak dewandaru pada uji aktivitas GST tersebut. Nilai IC_{50} (konsentrasi ekstrak yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST) dihitung menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak yang ditambahkan dan % inhibisi yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru

mampu menghambat aktivitas GST kelas pi ginjal tikus dengan nilai IC_{50} berturut-turut 438,62; 257,35 dan 112,86 $\mu\text{g/ml}$.

Kata Kunci: dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), glutathion S-transferase, asam etakrinat

ABSTRACT

Extracts of dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) have been reported to be an inhibitor of general classes (α , ι , and δ) of glutathione S-transferase (GST), but it had not been known yet the kind of GST (α , ι , or δ) which was inhibited by the extracts. The objective of this research was to know the inhibitory potency of extracts of dewandaru on δ (π) class rat's renal GST activity. The extracts were obtained by maceration method with chloroform, ethyl acetic, and ethanol as a solvent. To represent the π class of GST activity, ethacrinic acid was used as a specific substrate on the conjugation reaction with glutathion (GSH) was measured spectrometrically. Preparation of sitosol fraction which contains GST by centrifugation. Protein was determined according to the method of Lowry with bovine serum albumin (BSA) as the standard. In the determining IC_{50} (the concentration of extract which resulting in 50% of inhibitory potency on GST activity), the activity test of GST was added with extract of dewandaru in vary concentrations. IC_{50} was obtained from linier regression curve which stated the correlation between the log concentration of extract of dewandaru which was added and % inhibition resulted. The result shown that chloroform, ethyl acetic, and ethanolic extract of dewandaru inhibit the π class of rat's renal GST activity (EA substrate) with IC_{50} 438,62; 257,35 and 112,86 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Keywords: dewandaru (*Eugenia uniflora* L), π class glutathione S-transferase, ethacrinic acid

PENDAHULUAN

Glutathion S-transferase (GST) merupakan sekelompok enzim yang memiliki peran utama sebagai katalis enzimatik pada detoksifikasi senyawa elektrofilik melalui konjugasi dengan glutathion (GSH). (Mannervik & Danielson, 1988). Ada dugaan kuat bahwa GSH dan enzim yang terkait (GST) memegang peranan

pada proses resistensi sel terhadap obat antikanker (Black & Wolf, 1991). Dalam banyak kasus ditemukan peningkatan isoenzim kelas pi pada jaringan kanker payudara jauh lebih tinggi dibanding jaringan payudara normal pada pasien yang sama (Kelley dkk, 1994). Dilaporkan juga terjadinya ekspresi berlebihan GST kelas pi pada kanker nasofaring (Jayasurya dkk, 2002). Hal yang sama juga ditunjukkan pada tumor hepatik manusia (Van Bladeren & Van Ommen, 1991).

Peningkatan berlebihan aktivitas GST kelas tertentu tersebut menyebabkan terapi sel kanker dengan obat-obat sitostatik yang elektrofili umumnya akan mengalami resistensi karena sebagian besar obat sitostatik justru dimetabolisme melalui konjugasi GSH yang dikatalisis oleh GST. Detoksifikasi beberapa obat antikanker seperti 1,3-bis-(2-kloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), klorambusil, siklofosamid, melpalan, dan tiotepa yang mengalami konjugasi dengan glutathion juga dikatalisis oleh GST (Hayes & Pulford, 1995). Apabila kanker tersebut disertai dengan peningkatan GST berlebihan, maka dapat terjadi penurunan efektivitas obat sitotoksik yang digunakan pada terapi kanker tersebut. Pada keadaan seperti ini, untuk meningkatkan efektivitas terapi obat-obat sitotoksik elektrofili dapat ditempuh strategi melalui penggunaan bersama antara obat sitotoksik tersebut dengan inhibitor GST yang selektif.

Senyawa-senyawa fenol dalam tanaman (asam elegat, asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat) dilaporkan sebagai inhibitor *in vitro* terhadap GST (Das dkk, 1984). Beberapa senyawa flavonoid yaitu fisetin, myricetin, kaempferol, quercetin, baicalein, quercitrin, chrysin, baicalin, morin, rutin, apigenin dilaporkan juga dapat menghambat aktivitas GST (Iio dkk, 1993).

Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) adalah salah satu tanaman yang hidup tersebar di pulau Jawa dan Sumatera (Hutapea, 1991) mengandung senyawa seperti sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tanin dan antosianin (Einbond et al., 2004). Kandungan antosianin pada bagian buah telah diteliti oleh Einbond et al. (2004) sebagai antiradikal yang sangat aktif. Penelitian yang dilakukan Khotimah (2004) membuktikan daun dewandaru mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. Utami (2005) membuktikan adanya aktivitas antiradikal ekstrak daun dewandaru dan diduga senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa flavonoid.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru mampu menghambat aktivitas GST kelas umum (α , i , dan δ) dari hati dan ginjal tikus (Utami, 2007), namun belum diketahui pasti GST kelas α , i , dan δ yang dihambat.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah

ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) mampu menghambat secara in vitro aktivitas GST kelas δ (π) ginjal tikus menggunakan substrat spesifiknya yaitu asam etakrinat.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan penelitian yang digunakan berupa daun dewandaru diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu. Glutation, bovine serum albumin (BSA) dan reagen Folin Ciocalteu diperoleh dari Sigma Chem.Co. Asam etakrinat (AE) diperoleh dari Aldrich. Etanol, natrium hidroksida, natrium karbonat, kupri sulfat, kalium natrium tartrat, kalium dihidrogenfosfat dan dikalium hidrogen fosfat (kualitas pa) diperoleh dari E. Merck. Etanol, etil asetat dan kloroform kualitas teknis serta akuades dari Brataco. Tikus putih (Strain Wistar) dan makanan tikus pellet diperoleh dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Tip pipet (biru, kuning, putih) berbagai ukuran (Gilson). Sedangkan alat yang digunakan antara lain Spektrofotometer Genesys 10, pH Meter TOA HM-60S, ultrasentrifugator Hitachi SCP 85H, homogenizer, neraca Shimadzu tipe LS-6DT, Gilson Pipetman berbagai ukuran dan alat-alat gelas yang lazim

Jalannya Penelitian

Ekstrak daun dewandaru diperoleh dengan cara maserasi bertingkat serbuk daun dewandaru menggunakan pelarut berturut-turut kloroform, etil asetat dan etanol teknis.

Enzim GST dalam fraksi sitosol ginjal tikus disiapkan dengan metode Lundgren dkk. (1987) dan disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan. Penentuan kadar protein dalam fraksi sitosol ginjal menurut metode Lowry dkk. (1951) dengan *bovine* serum albumin sebagai baku. Kemudian dilakukan penentuan aktivitas GST pada reaksi antara GSH dengan substrat asam etakrinat (AE) menurut metode Habig dkk. (1974). Campuran reaksi (dalam kuvet) berisi $17\mu\text{l}$ fraksi sitosol liver tikus (kadar protein tertentu yang menghasilkan *rate* linier), $18\ \mu\text{l}$ GSH $10\ \text{mM}$ dan $15\ \mu\text{l}$ AE $10\ \text{mM}$ dalam $750\ \mu\text{l}$ volume akhir larutan $0,1\ \text{M}$ bufer fosfat pH 6,5. Pada studi inhibisi, $15\ \mu\text{l}$ ekstrak daun dewandaru berbagai seri konsentrasi ditambahkan pada fraksi sitosol dan diinkubasi selama 4 menit pada suhu kamar sebelum penambahan GSH dan AE. Dari hasil yang diperoleh berupa aktivitas GST dengan dan tanpa penambahan ekstrak, selanjutnya ditentukan nilai IC_{50} (konsentrasi ekstrak yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST) dihitung menggunakan

persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak yang ditambahkan dan % inhibisi yang dihasilkan.

Produk konjugat GS-AE hasil reaksi konjugasi antara GSH dengan AE dengan katalis GST diukur pada λ 270 nm dari menit ke 0 – 3 menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran berupa “ serapan/menit (*rate*).

Kecepatan pembentukan produk konjugat (V) dan % inhibisi dihitung menggunakan rumus :

$$V \text{ (nmol/min/mg protein)} = \text{Rate} / \text{GS-AE. tebal kuvet/kadar protein dalam campuran inkubasi}$$

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

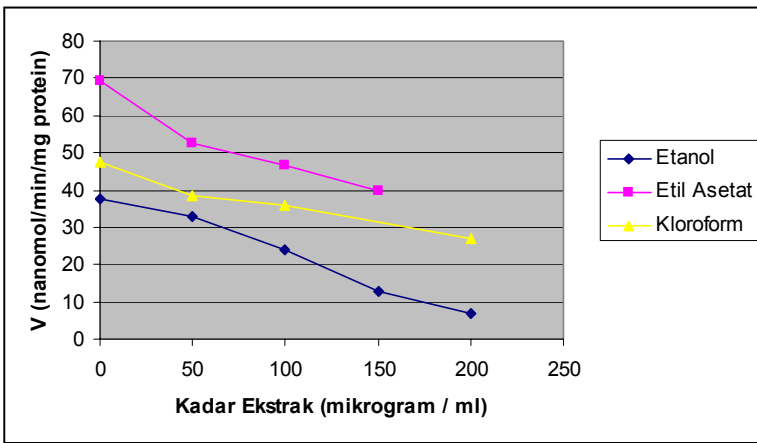
λ GS-AE pada 270nm = 5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Kemudian dibuat persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak dan % inhibisi yang dihasilkan. Nilai IC₅₀ diperoleh menggunakan persamaan garis regresi tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini digunakan pelarut organik etanol untuk melarutkan substrat maupun inhibitor yang kelarutannya terbatas dalam air. Namun demikian kadar total etanol pada campuran inkubasi harus dijaga kurang dari 5% karena jika kadar pelarut organik lebih besar dari 5% dapat menghambat aktivitas GST sebagaimana yang dilaporkan oleh Habig & Jakoby (1981).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat, dan etanol daun dewandaru mampu menghambat GST kelas *pi* ginjal tikus (Gambar 3), dimana kemampuan penghambatannya terhadap GST diantara ketiga ekstrak tersebut yang paling kuat adalah ekstrak etanol dengan nilai IC₅₀ 112,86 μ g/ml dan paling lemah adalah ekstrak kloroform (Tabel I).



Gambar 3. Kurva Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Dewandaru dan Aktivitas GST pada Reaksi Konjugasi antara GSH-AE yang Dikatalisis GST Ginjal Tikus

Tabel 1. Nilai IC₅₀ Ekstrak Daun Dewandaru dengan Substrat AE

Ekstrak	Kadar Protein (mg/ml)	Kadar (μg/ml)	Rate Δserapan/min	V (nanomol/min/mg protein)	% Inhibisi	IC ₅₀ (μg/ml)
Etanol	0,266	0	0,050	37,59		112,86
		50	0,044	33,08	12,00	
		100	0,032	24,06	36,00	
		150	0,017	12,78	66,00	
		200	0,009	6,77	81,99	
Persamaan regresi linier: $y = 117,671x - 191,525$; $r = 0,98552$						
Etil asetat	0,266	0	0,092	69,17		257,35
		50	0,070	52,63	23,91	
		100	0,062	46,62	32,60	
		150	0,053	39,85	42,39	
Persamaan regresi linier: $y = 37,670x - 40,805$; $r = 0,983046$						
Kloroform	0,266	0	0,058	47,36		438,62
		50	0,051	38,35	12,06	
		100	0,048	36,09	17,24	
		200	0,036	27,07	37,93	
Persamaan regresi linier: $y = 42,969x - 63,528$; $r = 0,94499$						

Senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas inhibisi GST kelas *pi* dalam ekstrak daun dewandaru diduga adalah senyawa fenol dan flavonoid. Gugus OH fenolik diduga mampu menghambat aktivitas GST karena mampu membentuk ikatan hidrogen dengan gugus pada residu asam amino pada sisi aktif enzim sehingga mengubah konformasi enzim menjadi tidak aktif. Beberapa senyawa flavonoid juga dilaporkan mampu menghambat aktivitas GST kelas *pi*, yaitu baikalein (Sudibyo & Lilis, 2005) dan naringenin (Utami, 2005).

Hasil penelitian Utami, dkk. (2005) menyebutkan kandungan fenolik ekstrak kloroform, etil asetat, dan etanol daun dewandaru, setara dengan asam galat, berturut-turut sebesar 10,973; 33,774 dan 105,816 mg/g ekstrak, sedangkan kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak kloroform, etil asetat, dan etanol daun dewandaru, setara dengan rutin, masing-masing 2,631; 32,662 dan 28,780 mg/g ekstrak. Kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak inilah yang diduga mampu menghambat aktivitas GST. Dugaan ini diperkuat dengan penelitian Das, dkk. (1984) dan Iio, dkk. (1993) yang melaporkan bahwa senyawa-senyawa fenol dalam tanaman dan senyawa flavonoid mampu sebagai inhibitor *in vitro* GST.

Iio, dkk. (1993) melaporkan bahwa potensi inhibisi flavonoid turunan flavon dapat ditetapkan secara kualitatif dari banyaknya gugus hidroksil fenolik. Semakin banyak gugus fenolik bebas, semakin besar potensi inhibisinya, dan potensi inhibisi turunan flavonol tidak ditentukan oleh jumlahnya tapi oleh posisi dari gugus hidroksil. Berdasarkan penelitian Utami, dkk. (2005) dapat diketahui kandungan senyawa fenol terbesar terdapat dalam ekstrak etanol dan kandungan senyawa flavonoid terbesar terdapat dalam ekstrak etil asetat, sedangkan pada ekstrak kloroform baik senyawa fenol maupun flavonoid kandungannya paling rendah. Hal ini mendukung hasil penelitian bahwa ekstrak etanol memiliki potensi inhibisi yang terkuat karena flavonoid yang tersari di ekstrak etanol kemungkinan memiliki gugus hidroksi fenolik yang banyak, sedangkan pada ekstrak etil asetat potensi penghambatannya lebih rendah daripada ekstrak etanol meskipun kandungan flavonoidnya lebih tinggi. Hal ini kemungkinan disebabkan flavonoid yang tersari di ekstrak etil asetat memiliki gugus hidroksil fenolik yang lebih sedikit dan posisi gugus fenolik yang kurang memungkinkan mengikat sisi aktif GST.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *pi* ginjal tikus, dimana kekuatan inhibisi berturut-turut dari yang paling kuat adalah ekstrak etanol ($IC_{50} = 112,86 \mu\text{g/ml}$), ekstrak etil asetat ($IC_{50} = 257,35 \mu\text{g/ml}$), dan ekstrak kloroform ($IC_{50} = 438,62 \mu\text{g/ml}$).

Saran

Perlu diteliti pengaruh ekstrak daun dewandaru terhadap aktivitas GST secara *in vivo* dan juga pengaruhnya terhadap sitotoksitas obat sitostatik dalam kultur sel kanker yang ekspresi GST-nya tinggi.

PERSANTUNAN

Terima kasih untuk LPPM UMS yang telah mendanai penelitian ini dan untuk Farida, Khusnul dan Agus yang telah membantu dalam penelitian di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Black, S.M. and Wolf, C.R., 1991, The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance, *Pharmacol. Ther.*, **51**, 139-154.
- Das, M., Bickers, D.R., Mukhtar, H., 1984, Plant Phenols as *in vitro* inhibitors of glutathione S-transferase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **120**, (2), 427-433.
- Einbond, L., Reynertson, K.A., Luo, X. D., Basile, M.J., Kennely, E.J., 2004, Anthocyanin Antioxidants From Edible Fruits, *Food Chem.*, **84**, 23-28.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B., 1974, Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, **249**, (22), 7130-7139.
- Habig, W.H. and Jakoby, W.B., 1981, Assays for differentiation of glutathione S-transferase, *Methods of Enzymol.*, **77**, 398-403
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J., 1995, The glutathione S-transferases supergene family : regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, **30** (6), 445-600.
- Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia III*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Iio, M., Kawaguchi, H., Sakoto, Y., Otonari, J., and Nitaha, H., 1993, Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferases and glutathione reductase, *Biosci. Biotech, Biochem.*, **57**, (10), 168-160.

- Jayasurya, A., Yap, W.M., Tan, N.G., Tan, B.K.H., and Bay, B.H., 2002, Glutathione S-transferases δ expression on nasopharyngeal cancer, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, **128**, 1396-1399.
- Kelley, M.K., Engqvist-Goldstein, A., Montali, J.A., Wheatly, J.B., Schmidt Jr., D.E., and Kauvar, L.M., 1994, Variability of glutathione S-transferases isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue, *Biochem. J.*, **304**, 843-848.
- Khotimah, K.D.S., 2004. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kloroform dan Metanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora*. L.) Terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Shigella Dysentriae* dan *Escherichia Coli*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagen, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lundgren, B., Meijer, J. and DePiere, J.W., 1987, Characterization of the induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases by 2-ethylhexanoic acid in mouse ginjal, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 114-121.
- Mannervik, B. and Danielson, U.H., 1988, Glutathione transferases-structure and catalytic activity, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337.
- Sudibyoy, M. dan Lilis, S., 2005, Inhibition of baicalein, a flavonoid from *Scutellaria baicalensis* on the pi class of rat's kidney of GST-activity in vitro, *J. Trad. Med.*, **10**, (33), 5-10.
- Van Bladeren, P.J. and Van Ommen, B., 1991, The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits, *Pharmacol. Ther.*, **51**, 35-46.
- Utami, W., Da'i, M., Sofiana, Y.S., 2005. Uji Aktivitas Penangkap Radikal dengan Metode DPPH serta Penetapan Kandungan Fenol dan Flavonoid dalam Ekstrak Kloroform, Ekstrak Etil Asetat, Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), *Pharmacon*, **6**, (1), 5-9.
- Utami, W., 2005, Pengaruh Naringenin dan Naringin secara *In Vitro* terhadap Aktivitas Glutathione S-Transferase Tikus, *Tesis*, Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 53.
- Utami, W., 2007, Pengaruh Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) terhadap Aktivitas Glutathione S-Transferase Ginjal Tikus secara *In Vitro* dengan Substrat 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen *Laporan Penelitian Reguler*, LPPM Universitas Muhammadiyah Surakarta, 19.