

# PENGARUH ANTIOKSIDAN FLAVONOID TERHADAP KADAR PROTEIN MIKROSOMAL HATI TIKUS YANG DIINDUKSI DENGAN KARBONTETRAKLORID

## EFFECT OF ANTIOXIDANT FLAVONOID ON MICROSOMAL PROTEIN CONCENTRATION OF RAT'S LIVER INDUCED BY CARBONTETRACHLORIDE

Agustina Dwi Wijayanti, Syarifuddin Tato dan Soesanto Mangkoewidjojo

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh antioksidan flavonoid rutin terhadap kadar protein mikrosomal hati tikus yang diinduksi dengan karbontetraklorid. Sebanyak 24 ekor tikus Wistar jantan, umur 3 bulan, berat rata-rata 200 gram, dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 6 ekor. Metode penelitian yang digunakan adalah metode Kumaravelu yang telah dimodifikasi. Kelompok I adalah kontrol yang diberi akuades 0,5 ml per oral. Kelompok II diberi flavonoid rutin 100 mg dalam 0,5 ml akuades per oral. Kelompok III diberi larutan  $\text{CCl}_4$  240 mg (0,7 ml) intra peritoneal. Kelompok IV diberi flavonoid rutin 100 mg dalam 0,5 ml akuades per oral dan larutan  $\text{CCl}_4$  240 mg (0,7 ml) intra peritoneal. Pemberian flavonoid dilakukan setiap hari dan suntikan  $\text{CCl}_4$  tiga kali dalam seminggu. Lama perlakuan adalah 14 hari. Setelah hari ke-14 tikus dibunuh dengan dekapitasi, hatinya ditimbang kemudian dibuat homogenat. Pembuatan homogenat hati dilakukan dengan ultrasentrifugasi. Pengukuran protein mikrosomal dilakukan dengan metode kolorimetri *coomassie brilliant blue* (Bio-Rad Protein Assay) dengan spektrofotometer Beckman DU-65. Hasil pengukuran protein mikrosomal pada kelompok II lebih tinggi dibandingkan kelompok III ( $p < 0,01$ ). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa daya antioksidan flavonoid rutin mampu menjaga kadar protein mikrosomal hati tikus yang diinduksi  $\text{CCl}_4$ .

**Kata kunci :** flavonoid, protein mikrosomal, hati,  $\text{CCl}_4$

### ABSTRACT

This research was conducted to evaluate the antioxidant effect of flavonoid rutin on the microsomal protein concentration of rat's liver induced by carbontetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). Twenty four male Wistar rats, 3 months, with 200 g of body weight average, were divided into 4 groups of 6 animals each. Group I as control was treated with 0,5 ml aquadest orally. Group II was given flavonoid rutin 100 mg dissolved in 0,5 ml aquadest orally. Group III was treated 240 mg (0,7 ml)  $\text{CCl}_4$  solution by intraperitoneal injection. Group IV was given 100 gr flavonoid rutin dissolved in 0,5 ml aquadest orally and 240 mg (0,7 ml)  $\text{CCl}_4$  solution by intraperitoneal injection. The modified Kumaravelu design was applied to this study. Flavonoid was administered daily and  $\text{CCl}_4$  injection was given three times a week for 14 days. After day 14, the animals were sacrificed by decapitation, livers were taken out and weighted for homogenization processes. The liver homogenate was made by ultracentrifugation. The microsomal protein was measured by colorimetric method using Bio-Rad Protein Assay. Result of this study demonstrated that protein concentration decreased in-group III compared with groups I and II ( $p < 0,01$ ). To conclude the antioxidant flavonoid rutin had ability to maintain the normal concentration of microsomal protein of hepatocytes of rats induced by  $\text{CCl}_4$ .

**Key words :** flavonoid, microsomal protein, liver,  $\text{CCl}_4$

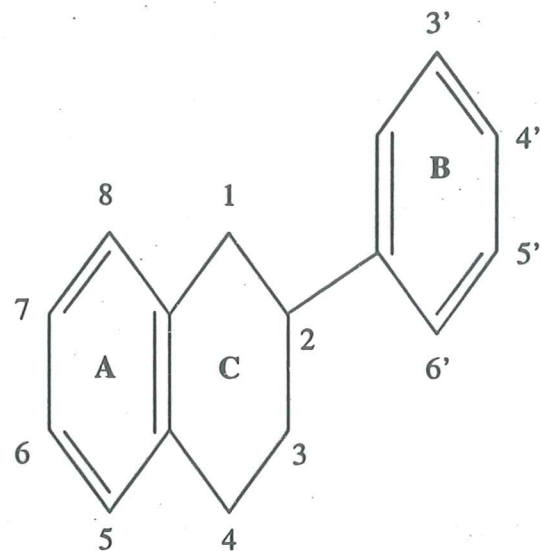
## PENDAHULUAN

Dewasa ini peranan senyawa atau obat antioksidan menjadi sangat penting karena meningkatnya mortalitas penyakit yang dipicu oleh sejumlah senyawa radikal bebas dan proses oksidasi lemak, misalnya penyakit jantung koroner dan aterosklerosis. Oksidasi asam lemak menyebabkan terbentuknya peroksida dan partikel-partikel yang sangat reaktif yang disebut radikal bebas, yang bisa merusak struktur membran lipid (Snitor and Crowley, 1984). Antioksidan atau agen pereduksi dapat melindungi jaringan dari proses oksidasi dengan menyediakan elektron untuk proses oksidasi tersebut. Salah satu senyawa oksidan adalah klorotetraklorid yang diketahui menyebabkan proses oksidasi dalam hati, mengganggu sintesis protein dan aktivitas beberapa enzim (Hayes, 1989). Di dalam sel hati, senyawa ini akan menghasilkan radikal bebas yang memicu proses oksidasi, mengganggu aktivitas beberapa enzim termasuk sitokrom P-450 dan mengikat makromolekul termasuk protein.

Flavonoid adalah kelompok senyawa polifenol, memiliki beragam struktur dan karakteristik kimia, terdapat sangat banyak dalam tanaman dan merupakan bagian dalam diet manusia. Sebanyak lebih dari 4.000 senyawa telah diketahui termasuk kelas besarnya yaitu golongan flavon, flavanon, *catechins*, antosianin, isoflavon, dihidroflavonol dan *chalcones*. Dalam diet kandungan terbanyak flavonoid terdapat pada teh (48% dari *total intake*), bawang merah (29%), dan apel (7%). Anggur merah juga kaya akan flavonoid (22,5 mg/L) (Hertog *et al.*, 1993). Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dan pengkelat logam yang banyak diteliti secara *in vitro* diantaranya oleh Afanas'ev *et al.* (1989) dan Hanasaki *et al.* (1994). Selain itu flavonoid dilaporkan juga memiliki banyak aktivitas diantaranya sebagai antibakteri, antiviral, antiinflamasi, antialergi (Hanasaki *et al.*, 1994) dan vasodilator (Duarte *et al.*, 1993). Gambar berikut merupakan struktur generik flavonoid serta sistem penomoran untuk membedakan posisi karbon pada molekulnya. A, B dan C adalah tiga cincin fenol (Cody, 1988).

Efek hepatotoksik klorotetraklorid ( $CCl_4$ ) sudah diketahui lebih dari 50 tahun. Sitotoksitas  $CCl_4$  terutama terjadi pada mitokondria serta aktivasi enzimatik terhadap senyawa  $CCl_4$  menjadi radikal bebas pada membran retikulum endoplasma. Pemberian antioksidan pada hewan dapat mengurangi toksitas  $CCl_4$  yaitu pemberian praperlakuan senyawa *propyl gallate* atau *ethoxiguin*

dan pemberian diet yang mengandung vitamin E, metionin dan selenium (Reynolds and Moslen, 1980).



Gambar Struktur generik senyawa flavonoid (Cody, 1988)

Hampir semua enzim yang diketahui adalah suatu protein. Protein sebagai enzim adalah makromolekul yang berfungsi sebagai katalisator berbagai reaksi kimia, karena memiliki kapasitas pengikatan spesifik terhadap berbagai molekul (Berg *et al.*, 2001). Reynolds and Moslen (1980) mengatakan metabolit  $CCl_4$  akan berikatan secara kovalen dengan protein dan lemak di dalam retikulum endoplasma beberapa menit setelah keracunan. Setelah satu jam keracunan, terjadi penurunan sintesis protein, depresi aktivitas enzim glukosa 6 fosfatase dan beberapa komponen enzim dalam *mixed function oxidase system* di dalam hati. Metabolit  $CCl_4$  berikatan dengan protein mikrosomal dan mengakibatkan kerusakan enzim mikrosomal termasuk sitokrom P-450. Ikatan kovalen antara metabolit toksik dengan protein dalam hati bersifat nekrogenik dan mengakibatkan nekrosis sel-sel hati (Anders, 1988). Pemberian  $CCl_4$  menghambat terjadinya sintesis protein di dalam sel hati dan dengan pengamatan mikroskop elektron terlihat dilatasi sisterna retikulum endoplasma dan hilangnya partikel-partikel ribosom dari membran. Selanjutnya pembentukan lipoprotein, protein hepatic, albumin dan fibrinogen menjadi terhambat (Cassaret and Doull, 1975).

## MATERI DAN METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ultrasentrifus RP-50 2 Hitachi, homogenizer *stainless steel* diameter 10 cm, spektrofotometer Beckman DU-65, timbangan digital Shimadzu Libror AEU-210, freezer, mikropipet 1 ml, tabung sentrifus, kuvet 1 ml, spet 1 ml, spet berkanul, parafilm dan beberapa tabung reaksi.

Bahan yang digunakan adalah flavonoid rutin (dari laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, UGM), tikus Wistar jantan (Unit Pengembangan Hewan Percobaan, UGM), CCl<sub>4</sub> (BDH limited Pooled, England) dan *bio-rad protein assay* (Bio-Rad Laboratory, Inc., USA). Larutan untuk pembuatan homogenat berupa bufer A yaitu 0,1 M Tris-asetat (pH 7,4) yang terdiri dari larutan KCl 0,1 M, EDTA 1mM dan 20 µM *butylated hydroxy toluene* (BHT). Bufer B yaitu 0,1 M kalium firofosfat (pH 7,4) yang terdiri dari 1 mM EDTA dan 20 µM BHT. Bufer C yaitu 10 mM Tris-asetat (pH 7,4) terdiri dari 1 uM EDTA dan 20% griserol. Bahan untuk pembuatan bufer didapatkan dari Merck Chemical, Co.Ltd, Jerman, kecuali BHT dari Sigma Chemical Co., USA.

Hewan diperlakukan sesuai dengan metode Kumaravelu *et al.* (1996) yang telah dimodifikasi. Pembuatan hemogenat dilakukan secara ultrasentrifugasi (Guergerich, 1989) dan pengukuran protein mikrosomal secara kolorimetrik dengan *bio-rad protein assay* (Anonimus, 2000) yang dibaca menggunakan kurva standar BSA (*bovine serum albumin*). Analisa data dilakukan dengan analisa varian satu arah (*Completely Randomized Design*) kemudian data dipresentasikan dalam bentuk rerata ± SD.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Protein mikrosomal merupakan protein yang dikandung oleh fraksi mikrosomal homogenat yang berasal dari retikulum endoplasma (Ganggoli and Phillips, 1996). Menurut Cassaret and Doull (1975) hambatan sintesis protein dalam sel hati terlihat secara elektron mikroskopi dengan ditandai terjadinya dilatasi sisterna retikulum endoplasma dan hilangnya partikel ribosom pada membran. Terhambatnya sintesis protein tersebut mengakibatkan gangguan pembentukan lipoprotein, protein hepatik, albumin dan fibrinogen. Pengukuran protein mikrosomal pada kelompok I, II dan IV menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibandingkan kelompok III (Tabel). Hasil pengukuran protein

mikrosomal secara lengkap dapat dilihat pada lampiran.

Tabel kadar protein fraksi mikrosomal hati tikus (rerata ± SD)

Kelompok	protein (mg/ml)
I (kontrol)	14,96 ± 1,5 **/oo
II (flavonoid)	13,6 ± 2,2 aa/c
III (CCl <sub>4</sub> )	10,36 ± 1,14 **/aa
IV (CCl <sub>4</sub> +flav)	10,9 ± 0,8 oo/c

Simbol yang sama di belakang angka menunjukkan hubungan perbedaan (signifikansi)

Simbol dua kali : sangat signifikan (p<0,01)

Simbol satu kali : signifikan (p<0,05)

Reynold and Moslen (1980) menyatakan bahwa aktivasi CCl<sub>4</sub> menjadi metabolit CCl<sub>3</sub> pada membran retikulum endoplasma akan merusak struktur dan fungsi lemak dan protein. Radikal bebas menghambat fungsi protein dengan mengikat protein dalam bentuk ikatan kovalen CCl<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>-protein. Ikatan kovalen merupakan ikatan yang kuat dan akan menghambat fungsi makromolekul yang terikat. Ikatan radikal bebas dengan protein atau lemak terjadi hanya dalam waktu beberapa jam setelah pemberian CCl<sub>4</sub>. Kerusakan pada membran retikulum endoplasma juga terjadi pada ribosom sehingga sintesis protein mikrosomal terganggu. Hasil pengukuran protein mikrosomal pada kelompok tikus yang diberi flavonoid (kelompok II) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok CCl<sub>4</sub> (kelompok III). Penelitian Nakamura *et al.* (2000) tentang antioksidan rutin yang diberikan secara oral (dengan dosis bertingkat 0,01 sampai 1 g/kg) menunjukkan ketergantungan efek terhadap dosis yang diberikan. Dengan demikian penambahan dosis flavonoid pada penelitian ini dimungkinkan dapat meningkatkan daya antioksidan dan perlindungan terhadap sintesis protein mikrosomal. Hasil ini menunjukkan bahwa flavonoid memiliki daya antioksidan yang mampu melindungi molekul protein dari radikal bebas CCl<sub>4</sub>. Flavonoid mencegah terjadinya ikatan metabolit CCl<sub>4</sub>-protein dengan membentuk radikal flavonoid dan akan bereaksi dengan metabolit CCl<sub>4</sub> membentuk kompleks non toksik yang kemudian diekskresikan ke luar tubuh (Torel *et al.*, 1986).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa daya antioksidan flavonoid rutin mampu menjaga konsentrasi protein mikrosomal hati yang terlihat pada kelompok flavonoid yang dibandingkan dengan kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan. Konsentrasi protein mikrosomal lebih tinggi ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan kelompok  $\text{CCl}_4$  menunjukkan bahwa flavonoid mampu mengikat metabolit toksik  $\text{CCl}_4$  sehingga mencegah ikatan metabolit tersebut dengan protein mikrosomal. Kadar protein kelompok flavonoid +  $\text{CCl}_4$  lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok  $\text{CCl}_4$  dan ini menunjukkan bahwa ada aktivitas antioksidan yang mampu menaikkan sintesis protein.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji daya antioksidan flavonoid terhadap jenis toksikan yang lain. Penelitian yang intensif tentang keterlibatan enzim mikrosomal yang lain (misalnya glukosa 6 fosfatase dan sitokrom P-450) juga perlu dilakukan untuk mengetahui seberapa jauh daya antioksidan yang dimiliki senyawa flavonoid terhadap toksisitas  $\text{CCl}_4$ . Metode penelitian ini masih perlu diperbaiki terutama untuk menentukan dosis flavonoid dan  $\text{CCl}_4$  yang paling tepat sehingga didapatkan hasil yang optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A., Kostyuk, V.A., and Potapovitch, A.I. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.
- Anders, M.,W. 1988. *Bioactivation mechanism and hepatocellular. The Liver: Biology and Pathobiology.* Edited by M. Arias, M. Jakoby, H. Popper, D. Schechter, D.A. Shafritz. Raven Press Ltd, New York. 394-395.
- Anonimus. 2000. *Bio-Rad Life Science Product.* Bio-Rad Lab. Inc. Alfred Nobel Dynamic Hercules. CA 94549. USA. 215.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. 2001. *Biochemistry.* 5<sup>th</sup> ed. John Hopkins University School of Medicine. W.H. Freeman and Company. New York. 43-51, 78, 89.
- Casarett, L.,J., and Doull J. 1975. *Toxicology: The Basic Science of Poisons.* Mac Millan Pub. Co. Inc. New York. 170-175.
- Cody, V. 1988. *Crystal and molecular structure of flavonoid. In Plant Flavonoid in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties.* Alan R. Liss. New York. NY USA. 29-44.
- Duarte, J., Vizcaino, F.P., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J., and Zarzuelo, A. 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 24: 857-862.
- Ganggoli, S.D. and Philips, J.C. 1996. The metabolism and disposition of xenobiotic. *Experimental Toxicology. The basic issues.* 2<sup>nd</sup> ed., Ed. by Anderson, A. and Conning, D.M. Atheneum Press Utd. Gateshead. Tyne and Wear. 154.
- Guengerich, F.,P. 1989. *Characterization of Enzymes.* In : Principles and Methods of Toxicology. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. New York. 760.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., and Fukui, S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol.Med.* 16: 845-850.
- Hayes, A.W. 1989. *Principles and Methods of Toxicology.* 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. New York. 613-614.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., and Kromhout, D. 1993. *Dietary antioxidant flavonoid and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study.* *Lancet.* 342, 1007-1011.
- Kumaravelu, P., Subramaniam, S., Dakshinamoorthy D.P., Devaraj N.S. 1996. The antioxidant effect of eugenol on  $\text{CCl}_4$ -induced erythrocyte damage in rats. *J. Nutr. Biochem.* 7: 23-28.
- Nakamura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y. 2000. Effects of Quercetin and Rutin on Serum and Hepatic Lipid Concentrations, Fecal Steroid Excretion and Serum Antioxidant Properties. *J. Health Sci.* 46(4): 229-240.
- Snitor, C.J.W. and Crowley, M.F. 1984. *Nutrition Principle and Application in Health Promotion.* 2<sup>nd</sup> ed., T.B. Lippincott Company. Philadelphia. 254-255.
- Torel, J., Cillard, J., and Cillard, P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25: 383-385.