

Aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor glutation s-transferase kelas *mu*

Activity of propyl *p*-benzoyloxybenzoate as *mu*-class glutathione s-transferase inhibitor

Agnes Nora Iska Harnita¹⁾, Enade Perdana Istyastono¹⁾ dan Sudibyo Martono²⁾

¹⁾ Lab. Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

²⁾ Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Obat anti-inflamasi non-steroid merupakan salah satu golongan obat yang paling sering diresepkan. Aktivitas anti-inflamasi non steroid dilaporkan melalui penghambatan sintesis prostaglandin, suatu mediator inflamasi. Proses tersebut dapat melalui penghambatan enzim siklooksigenase, penangkapan radikal oksigen, maupun penghambatan glutathione S-transferase (GST) kelas *mu*. Aspirin merupakan obat anti-inflamasi yang digunakan sejak seratus tahun yang lalu dan dilaporkan selektif COX-1 yang berdampak pada banyaknya efek samping yang ditimbulkan, antara lain: tukak lambung. Propil *p*-benzoiloksibenzoat merupakan senyawa baru yang diduga memiliki aktivitas anti-inflamasi dan diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat anti-inflamasi dengan efek samping yang minimal.

Uji penghambatan aktivitas GST dilakukan menggunakan model reaksi pembentukan konjugat GS-CNB melalui konjugasi 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) dengan glutathione (GSH) dengan katalis enzim GST. Enzim GST dari fraksi sitosol hati tikus disiapkan dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren. Penetapan kadar protein dalam fraksi sitosol dilakukan secara spektrofotometri menggunakan baku *bovine* serum albumin. Kemudian dilakukan penentuan aktivitas GST pada reaksi pembentukan konjugat GS-CNB melalui konjugasi DCNB dengan GSH, diikuti dengan penentuan nilai IC₅₀ senyawa propil *p*-benzoiloksibenzoat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu* dengan IC₅₀ = 111,77 µM sebagai hasil ekstrapolasi.

Kata kunci : Anti-inflamasi, propil *p*-benzoiloksibenzoat, glutathione S-transferase (GST) kelas *mu*.

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most prescribed medicines. Anti-inflammatory activity was reported to have relationship with the inhibition of prostaglandin synthesis, one of the inflammation mediators. The inhibition mechanism might be through the cyclooxygenase (COX) inhibition, oxygen radical scavenging, and *mu*-class glutathione S-transferase (GST) inhibition. Aspirin has been used as a NSAID since a hundred years ago and was reported as cyclooxygenase-1 (COX-1) selective inhibitor. The selectivity leads to gastrointestinal ulceration. Propyl *p*-benzoyloxybenzoate was a new compound which was predicted to have anti-inflammatory activity and would be developed to be an NSAID with minimum side effect.

mu-class GST inhibition was examined using formation reaction model of GS-CNB conjugate through conjugation of 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) and glutathione (GSH) with GST (prepared from rat's liver) as a catalyst. GSTs were isolated from the rat liver cytosolic fraction by

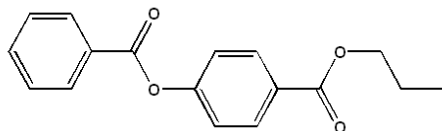
centrifugation according to Lundgren. Protein concentration of the cytosol was determined spectrophotometrically by using *bovine* serum albumin as a standard. The GST activity was determined using conjugation reaction rate between DCNB and GSH, followed by determination of IC₅₀ of propyl *p*-benzoiloksibenzoate.

The result showed that propyl *p*-benzoiloksibenzoate has activity as a *mu*-class GST inhibitor with IC₅₀ = 111.77 μM as the result from extrapolation.

Key words: Anti-inflammatory, propyl *p*-benzoiloksibenzoate, inhibitor, *mu*-class glutathione S-transferase (GST).

Pendahuluan

Propil *p*-benzoiloksibenzoat (Gambar 1) merupakan senyawa yang diharapkan memiliki aktivitas anti bakteri karena disintesis dari propil *p*-hidroksibenzoat dan benzoil klorida yang memiliki aktivitas anti bakteri (Florensa, 2003). Secara struktural, propil *p*-benzoiloksibenzoat juga diduga memiliki aktivitas anti-inflamasi. Aktivitas tersebut terkait dengan dua gugus ester yang dimilikinya. Gugus tersebut diharapkan dapat bertindak seperti pada aspirin dalam mekanisme anti-inflamasinya (Roth *et al.*, 1975 c.f. Vane and Botting, 1996; Wennogle *et al.*, 1995 c.f. Vane and Botting, 1996).



Gambar 1. Struktur propil *p*-benzoiloksibenzoat

Obat anti-inflamasi non-steroid merupakan salah satu golongan obat yang paling sering diresepkan (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Aktivitas anti-inflamasi non steroid dilaporkan melalui penghambatan sintesis prostaglandin, suatu mediator inflamasi (Vane and Botting, 1996). Proses tersebut dapat melalui penghambatan enzim siklooksigenase (COX) (Vane and Botting, 1996), penangkapan radikal oksigen (Halliwell *et al.*, 1987) maupun penghambatan glutathione S-transferase (GST) kelas *mu* (Ujihara *et al.*, 1988).

Metodologi

Bahan

Glutathione (GSH), *bovine* serum albumin (BSA) (Sigma Chem. Co., USA), senyawa 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB)(Aldrich),metanol,

etanol, kalium dihidrogen fosfat, dikalium hidrogen fosfat, CuSO₄ dan NaOH (kualitas p.a. E. Merck, Germany), tip pipet berbagai ukuran (*blue*, *white*, dan *yellow*). Senyawa propil *p*-benzoiloksibenzoat hasil sintesis (Florensa, 2003). Tikus putih (strain *Wistar*) dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Pelet pakan tikus dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Alat

Spektrofotometer UV-Vis (Genesys-5 Milton Roy), pH Meter (TOA HM-60S), ultrasentrifugator (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, type LS-6DT) dan *delivery* pipet (Gilson Pipetman) berbagai ukuran, dan alat-alat gelas yang lazim.

Jalannya penelitian

Penyiapan fraksi sitosol yang mengandung GST kelas *mu*

Tikus jantan berat 200-220 g sebanyak 10 ekor, diadaptasikan dalam kandang dengan pemberian pakan pelet dan minum air ledeng *ad libitum*, selama satu minggu. Setelah waktu perlakuan selesai, tikus dipuasakan 24 jam sebelum dibunuh dan diambil hatinya untuk penyiapan fraksi sitosol yang mengandung enzim GST dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren *et al.* (1987) dengan sedikit modifikasi. Kadar protein dalam fraksi sitosol (yang mengandung enzim GST) ditetapkan secara spektrofotometri visibel dengan menggunakan BSA sebagai pembanding menggunakan metode Biuret. Fraksi sitosol yang diperoleh disimpan pada suhu -80°C sampai saat digunakan untuk konjugasi DCNB dengan GSH.

Penetapan aktivitas enzim GST kelas *mu* (Habig *et al.*, 1974)

Ke dalam kuvet 1 ml dimasukkan larutan 50 mM DCNB dalam etanol (75,00 μL), larutan 50 mM GSH dalam akuades (10,05 μL), fraksi sitosol (mengandung GST) hati tikus (17,50 μL)

dan bufer fosfat 0,1 M pH 7,5 (ad 750 μ L). Produk konjugat GS-CNB yang terbentuk diukur pada λ 345 nm dari menit ke-0 hingga ke-3 menggunakan spektrofotometer UV-Vis (program *simple kinetic*). Hasil pengukuran berupa *rate* (Δ serapan per menit). Kemudian dihitung aktivitas enzim (V) GST kelas *mu* dari *rate* yang didapat:

$$V = \text{rate} / \Delta \epsilon_{\text{GS-CNB}} \cdot \text{tebal kuvet} / \text{kadar protein (mg/ml)}$$

Persen (%) penghambatan dihitung dengan rumus :

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

Analisis hasil

Aktivitas yang diperoleh dari penambahan senyawa uji pada berbagai konsentrasi dilakukan uji statistik *general linear model* (GLM) pada taraf kepercayaan 95%. Jika aktivitas dengan penambahan inhibitor dinyatakan berbeda bermakna secara statistik maka senyawa tersebut merupakan inhibitor dan ditentukan nilai IC_{50} (yaitu konsentrasi inhibitor yang menghasilkan penghambatan aktivitas GST sebesar 50%) dengan menggunakan persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi inhibitor dengan % penghambatan (inhibisi) yang dihasilkan.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil uji penghambatan aktivitas GST kelas *mu* oleh propil *p*-benzoiloksibenzoat disajikan pada Tabel I. Kurva hubungan

Tabel I. Aktivitas spesifik GST kelas *mu* (pada reaksi konjugasi GSH-DCNB) dengan dan tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat berbagai konsentrasi

Replikasi	Aktivitas*) (nanomol menit ⁻¹ (mg protein) ⁻¹) pada konsentrasi				
	0 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
1.	3,549	3,094	2,730	2,639	1,820
2.	3,549	3,276	2,730	2,275	2,184
3.	3,730	3,367	3,094	2,548	1,911
4.	3,549	3,094	3,094	2,366	1,911
Purata	3,594	3,207	2,912	2,457	1,956
SD**)	0,091	0,136	0,210	0,166	0,158
CV***) (%)	2,532	4,241	7,212	6,756	8,078

Keterangan :

*) Dengan konsentrasi protein dalam fraksi sitosol = 1,29 mg/mL;

tebal kuvet = 1 cm; dan $\Delta \epsilon_{\text{GS-CNB}} = 8,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

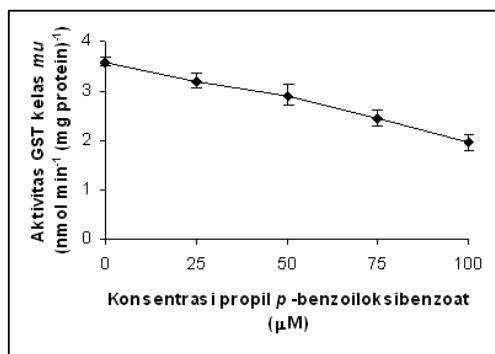
***) SD : *standard deviation*

***) CV : *coefficient of variation*

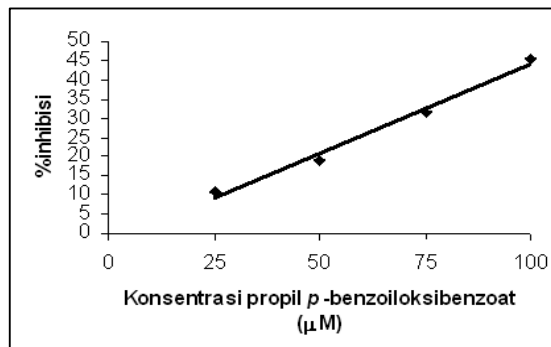
konstruksi propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan aktivitas (Gambar 2). Kurva tersebut memperlihatkan adanya penurunan aktivitas setiap penambahan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat. Hasil uji statistik dengan metode GLM pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa penurunan aktivitas setiap penambahan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat berbeda bermakna. Hal ini mengindikasikan bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu*.

Potensi penghambatan GST kelas *mu* oleh propil *p*-benzoiloksibenzoat (Tabel II) dan Gambar 3. Potensi penghambatan dinyatakan dalam persen (%) penghambatan yang didapat dari selisih antara purata aktivitas pada konsentrasi tertentu propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan purata aktivitas tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat, dibagi purata aktivitas tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat, dikalikan 100 %.

Berdasar data pada Tabel II dan Gambar 3 dapat dilakukan perhitungan IC_{50} (kemampuan suatu senyawa dalam menurunkan aktivitas GST kelas *mu* sebesar 50 %) dari propil *p*-benzoiloksibenzoat yaitu sebesar 111,77 μ M (hasil ekstrapolasi). Hasil ini menunjukkan bahwa meskipun memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu*, nilai IC_{50} propil *p*-benzoiloksibenzoat jauh lebih besar dibanding dengan kurkumin, suatu



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan aktivitas GST kelas *mu* (pada reaksi konjugasi GSH-DCNB)



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan % penghambatan

Tabel II. Potensi propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST kelas *mu*

Konsentrasi (µM)	% Penghambatan	Persamaan garis regresi linier
25	10,76	$Y^*) = 0,47X^{**}) - 2,53$ Jadi IC ₅₀ = 111,77 µM (hasil ekstrapolasi)
50	18,99	
75	31,65	
100	45,57	

Keterangan :

*) Y : % Penghambatan ; **) X : Konsentrasi inhibitor (µM)

senyawa anti-inflamasi yang terdapat dalam tanaman *Curcuma longa*, L. (Supardjan, 1999) yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu* dengan nilai IC₅₀ = 5,5 µM (Sudibyo, 2000). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat relatif tidak memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu*.

Kesimpulan

Propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST kelas *mu*

dengan IC₅₀ = 111,77 µM sebagai hasil ekstrapolasi.

Ucapan Terima Kasih

Diucapkan terima kasih kepada Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui surat perjanjian pelaksanaan Penelitian Dasar nomor 106/P2IPT/DPPM/PID/III/2004 tanggal 1 (satu) bulan Maret tahun 2004.

Daftar Pustaka

- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L., 2002, COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression, *PNAS*, 99 (21), pp. 13926-13931.
- Florensa, N.A., 2003, *Sintesis propil p-benzoilbenzoat melalui modifikasi metode Schotten-Baumann*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- 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), pp. 7130-7139.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.J., and Arouma, O.S., 1987, The deoksiribosa method : A simple test tube assay for determination of rate constant for reaction of hydroxyl radicals, *Anal. Biochem.*, 165, pp. 215-219.
- Lundgren, B., Meijer, J., and DePierre, J.W., 1987, Characterization of the induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases by 2-ethylhexanoic acid in mouse liver, *Drug Metab. Dispos.*, 15, pp. 114-121.
- Roth, G.J, Stanford, N., and Majerus, P.W., 1975, Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2, pp. 3073-3076.
- Sudibyo, M., 2000, *Inhibition of glutathione S-transferase by curcumin and its derivatives*, *Molecular mechanisms and qualitative structure-activity relationships*, Dissertation, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia
- Supardjan, A. M., 1999, *Synthesis and anti-inflammatory activity of Some 4-substitued curcumin derivatives*, Dissertation, Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Vane, J.R., and Botting, R.M., 1996, Overview-mechanism of action of anti-inflammatory drugs, in *Improved Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs COX-2 Enzyme Inhibitors*, Edited by Sir John Vane, Dr. Jack Botting and Dr. Regina Botting, pp. 1-28, Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press, Great Britain.
- Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, H., and Urade, Y., 1988, Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin H₂ by various GSTs isoenzymes, *Archs. Biochem. Biophys.*, 264, pp. 428-437.
- Wennogle, L.P., Liang, H., and Quintavalla, J.C., 1995, Comparison of recombinant cyclooxygenase-2 to native isoform: Aspirin labelling of the active site, *FEBS Lett.*, 371, pp. 315-320.