

Research Article

**EFFECT OF GLUTATHIONE ON MDA (MALONDYALDEHIDE) PLASMA AND SOD (SUPEROXYDE DYSMUTASE) ERYTHROCYTE ON WHITE RAT (RATTUS NORVEGICUS)
INDUCED BY PARACETAMOL**

Liza Yudistira Yusan¹ , Karma Budiman² , Choesnan Effendi³

¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

²Department of Community Pharmacy, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

³ Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Glutathione has a role to neutralize free radicals and reactive oxygen compounds, as well as to maintain exogenous antioxidants. Indicators to show the side effect of paracetamol is elevation of transaminase enzymes in plasma. The increase of free radicals is indicated by an increase in MDA (Malondyaldehyde) and a decrease in SOD (Superoxyde Dysmutase). The aim of the study is to know the effects of external glutathion on MDA and SOD levels in rats induced by Paracetamol (PCT). This study used four groups for each treatment : the first group (only given food standards); The second group (fed standard plus PCT); The third group (fed standard plus PCT and GSH dose of 600 mg / kg); The fourth group (fed standard plus PCT and GSH dose of 1200 mg / kg). GSH reduced significantly MDA plasma level ($p=0,004$), but in SOD level there is no differences among these groups. In our conclusion, GSH can be used alternatively to minimize the toxic effects of Paracetamol

Keywords : Glutathione, MDA plasma, erythrocyte SOD, Hepatotoxicity, Paracetamol

ABSTRAK

Glutation berperan untuk menetralkan radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif, serta mempertahankan antioksidan eksogen. Indikator yang digunakan untuk menunjukkan efek samping parasetamol antara lain enzim transaminase yang meningkat di plasma darah, peningkatan radikal bebas yang ditunjukkan dengan kenaikan kadar MDA (Malondyaldehyde) dan penurunan SOD (Superoxyde Dysmutase). Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh pemberian glutathion eksternal terhadap kadar MDA dan SOD pada tikus yang diinduksi dengan Parasetamol (PCT). Tikus dibagi menjadi 4 kelompok: kelompok pertama (hanya diberi makanan standart); Kelompok kedua (diberi makanan standart ditambah PCT); kelompok ketiga (diberi makanan standart ditambah PCT dan GSH dosis 600 mg/kg BB); Kelompok keempat (diberi makanan standart ditambah PCT dan GSH dosis 1200 mg/kgBB). Pemberian GSH menurunkan MDA plasma secara bermakna ($p=0,004$), sedangkan pada pengukuran SOD plasma tidak ada perubahan. Sebagai kesimpulan, pemberian GSH dapat meminimalkan efek toksik dari pemberian Parasetamol

Kata kunci : Glutation, MDA plasma, SOD eritrosit, Hepatotoksik, Parasetamol

Correspondence: Liza Yudistira Yusan, Departemen Farmasi Klinis, Fakultas Kedokteran, Universitas Hang Tuah, Surabaya, Indonesia. **E-mail:** liza.yusan33@gmail.com

PENDAHULUAN

Parasetamol merupakan obat analgesik yang banyak digunakan oleh masyarakat serta relatif aman pada dosis terapi. Namun, apabila dikonsumsi berulang kali dalam jangka waktu yang lama maupun dalam dosis yang berlebihan akan menimbulkan intoksikasi terutama pada organ hati. Beberapa indikator yang dipakai untuk menunjukkan efek samping parasetamol antara lain peningkatan enzim transaminase dalam plasma, peningkatan radikal bebas yang ditunjukkan dengan kenaikan kadar MDA (Malondyaldehyde) dan penurunan SOD (salah satu marker antioksidan). Pada tingkat terapeutik, parasetamol terutama mengalami metabolisme di hati oleh glucuronidase dan sulphation. Namun, sebagian kecil mengalami bioaktivasi sitokrom P450 (CYP450) serta dimediasi untuk N-asetil-p-benzoquinoimine (NAPQI), yang dapat dengan cepat diredam oleh glutathion (GSH). Efek hepatotoksik oleh parasetamol dapat meningkatkan radikal bebas dan menurunkan antioksidan [1].

Glutathion (Glutathione) adalah suatu antioksidan endogen yang kuat dan merupakan tripeptida intraselular dengan nama kimia Gamma-Levo-glutamyl-L-sisteinil-glisina (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine /GSH). Selain sebagai antioksidan yang kuat, glutathion juga berperan sebagai detoksikan dan modulasi proliferasi sel. [2,3]. Glutathion berperan langsung dalam netralisasi radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif, serta mempertahankan antioksidan eksogen seperti vitamin C dan E [4]. Pengetahuan baru tentang peraturan gizi metabolisme GSH sangat penting untuk

pengembangan strategi yang efektif untuk meningkatkan kesehatan dan untuk mengobati penyakit kwashiorkor, kejang, penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, penyakit hati, cystic fibrosis, anemia sel sabit, HIV, AIDS, kanker, serangan jantung, stroke, dan diabetes.[3]

Glutathion endogen tidak cukup untuk menetralkan stress oksidatif akibat aktivitas fisik yang berat dan lama, sehingga perlu penambahan antioksidan eksogen antara lain glutathion, vitamin C, dan vitamin E. Pada penelitian ini dibatasi hanya pada pemberian glutathion yang diharapkan dapat menurunkan MDA dan meningkatkan SOD. Glutathione melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh oksigen yang mengandung molekul tidak stabil yang merupakan produk samping dari produksi energi. [5].

Glutathion adalah pelindung utama dari kulit, lensa, kornea, dan retina dari kerusakan radiasi dan senyawa biokimia lainnya. P450 detoksifikasi dalam hati, ginjal, paru-paru, usus, epitel dan organ lainnya. Glutathion adalah kofaktor penting bagi banyak enzim yang membutuhkan tiol, dan membantu menjaga tempat aktif redoks-sensitif pada enzim dalam mengurangi keadaan yang diperlukan. Keseimbangan GSH / GSSG sangat penting untuk homeostasis, menstabilkan spektrum biomolekular selular, dan memfasilitasi kinerja selular dan kelangsungan hidup. Kegiatan enzim yang terlibat dalam metabolisme GSH dikendalikan pada tingkat transkripsi, translasi, dan posttranslasi. [6]

MDA serum merupakan salah satu biomarker dari stres oksidatif. Stres oksidatif

dapat dipicu jika hasil dari Spesies Oksigen Reaktif (SOR) lebih besar dibanding yang dapat diatasi oleh mekanisme pertahanan sel. Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*) untuk menetralisasi dampak negatif dari SOR. [7,8]

Mekanisme kerusakan sel ataupun jaringan yang disebabkan oleh serangan radikal bebas, paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penyusun membran sel sehingga liver mengeluarkan SGOT & SGPT. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid dilakukan dengan mengukur produk akhirnya, malondialdehyde (MDA), yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan bersifat toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif [9].

SOD adalah enzim antioksidan yang mempunyai efek kuat dan merupakan pertahanan tubuh pertama dalam menghadapi radikal bebas. Superoxide merupakan yang utama sebagai perantara dalam reaksi biokimia. [10] Aktivitas SOD dapat digunakan sebagai marker pengukuran stress oksidatif dalam tubuh. Kadar SOD dapat juga dipengaruhi oleh usia, jika semakin tua usia seseorang, maka kadar SOD akan semakin menurun. Selain itu kadar SOD juga dikendalikan oleh faktor genetik. [9] Pada penelitian ini, pemberian Glutathione eksogen diharapkan dapat meningkatkan antioksidan yang ada di dalam tubuh.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *post test only control group design*. Subjek yang digunakan berupa tikus putih yang mendapat paparan parasetamol. Dalam rancangan ini subjek dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Kelompok 1, tikus yang diberi makanan standar selama 7 hari. Kelompok 2, tikus yang diberi makanan standar dan Parasetamol selama 7 hari. Kelompok 3 tikus diberi makanan standar ditambah parasetamol dan GSH 600m/KgBB selama 7 hari. Kelompok 4, tikus diberi makanan standar ditambah parasetamol dan GSH 1200m/KgBB selama 7 hari. Pada hari terakhir semua kelompok dilakukan pengukuran kadar MDA dan SOD.

Kriteria inklusi pada penelitian ini yakni tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar, jenis kelamin jantan, usia antara 2-3 bulan, berat badan antara 150-200 gram, sehat fisik yang ditandai dengan bermata jernih, bulu tebal dan mengkilap, gerakannya yang aktif dan fesesnya baik atau tidak lembek. Kriteria eksklusinya yakni tikus mati atau sakit dalam masa adaptasi, memiliki cacat tubuh, berat badan tikus tidak memenuhi standar. Kriteria drop out yakni tikus mati atau sakit serta diare selama masa penelitian berlangsung.

Pada percobaan eksperimental ini bisa terjadi kemungkinan kematian hewan coba (f) $\pm$ 10%, sehingga besar sampel dikalikan dengan $1/(1-f)$, [11] sehingga besar sampel keseluruhan adalah 28 hewan coba. Penentuan sampel dilakukan dengan cara simple random sampling. Simple random sampling ialah cara pengambilan sampel dari anggota populasi secara acak tanpa memperhatikan strata (tingkatan) yang ada dalam

anggota populasi tersebut [12]. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik oleh komisi etik, Universitas Hang Tuah dengan nomor etik Nomor laik etik 08/HC/EC-KEPUHT/X/2016.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yakni hewan coba *Rattus norvegicus* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, pakan tikus standar (pelet), aquadest, ketamin, parasetamol dan GSH.

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni Kandang dan tempat makan *Rattus norvegicus* Wistar, sekam, timbangan analitik, sonde (*pediatric feeding tube size 8*), spuit injeksi ukuran 2,5 cc untuk mengambil darah, tabung sampel sebagai wadah darah *Rattus norvegicus*.

Prosedur Penelitian

a. Tahap persiapan

Persiapan hewan coba : pembuatan larutan Parasetamol (Parasetamol bentuk serbuk murni dengan dosis satu kali pemberian adalah 500 mg untuk dosis manusia. Berdasarkan tabel konversi dosis manusia (Berat Badan 70Kg) dengan hewan coba tikus (Berat Badan tikus 200 gram) adalah 0,018. Dosis yang disuntikkan sebanyak 9 mg/200 gram BB tikus). Pembuatan Larutan Glutation (Glutation diberikan secara intraperitoneum dengan dosis 600 mg/kilogram BB dan 1200 mg/KgBB, sekali sehari selama 7 hari. Berdasarkan tabel konversi dosis manusia (Berat Badan 70Kg) dengan hewan coba tikus (Berat Badan tikus 200 gram) adalah 0,018. Dosis yang disuntikkan untuk 600 mg/kilogram BB sebanyak 10,8 mg/200 gram BB tikus sedangkan untuk dosis 1200 mg/KgBB yang disuntikkan ke

tikus dosisnya sebanyak 21,6 mg/200 gram BB tikus).

b. Tahap pra perlakuan

28 ekor *Rattus norvegicus* dilakukan penimbangan berat badan kemudian dibagi menjadi 4 kelompok.

C. Tahap perlakuan

Pemberian makanan standar selama 7 hari kemudian dilanjutkan pada tahapan penelitian.

Tahap pengambilan sampel (serum)

Pengambilan sampel darah tikus dilakukan dengan cara cardiac puncture. Pengambilan darah dengan cardiac puncture merupakan cara yang baik untuk memperoleh darah dalam jumlah besar tetapi prosedur ini merupakan prosedur terakhir [13].

Pengukuran Kadar MDA

Dipersiapkan dua buah tabung yang digunakan untuk standar serta pemeriksaan sampel. Kedalam tabung dimasukkan 100 µl sampel darah tikus, sedangkan ke dalam tabung standar dimasukkan 100 µl larutan standar. Kedua tabung ditambahkan NaCl 0,9% sebanyak 200 µl kemudian ditambahkan Aquadest 550 µl dan TCA 10% sebanyak 100 µl. Setelah itu kedua larutan didalam tabung tersebut dikocok dengan menggunakan vortex. Setelah itu, kedua larutan dalam tabung tersebut ditambahkan HCl 1 N sebanyak 250 µl, Na-Thiosianat 1% sebanyak 100 µl kemudian kedua larutan dikocok dengan menggunakan vortex. Kemudian dipanaskan diatas waterbath dengan suhu 100°C selama 20 menit. Setelah itu dibiarkan sebentar dalam suhu ruang kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Lapisan

supernatan diambil sebanyak 300 µl untuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

Pengukuran Kadar SOD

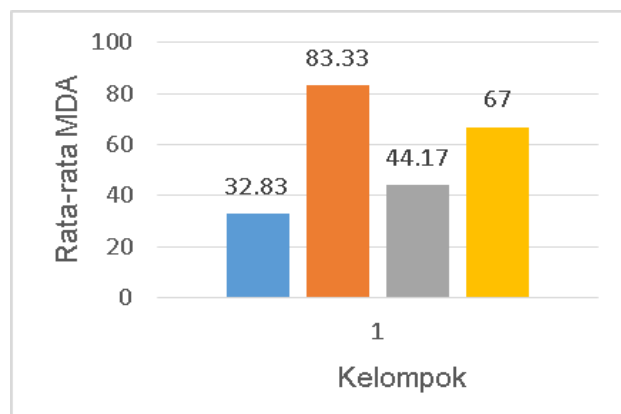
Pemeriksaan kadar antioksidan SOD dilakukan berdasarkan buku manual dari Randox laboratories, 2006. Dipersiapkan dua buah tabung yang digunakan untuk standar serta pemeriksaan sampel plasma. Kedalam tabung sampel dimasukkan 0,05 ml sampel plasma, sedangkan ke dalam tabung standar dimasukkan 0,05 ml larutan standar. Kedua tabung ditambahkan 1,7 ml larutan *mixed substrate*. Kedua larutan dalam tabung dikocok dengan mesin vortex. Terakhir ditambahkan larutan xanthine oxidase 0,25 ml ke dalam masing-masing tabung dan dikocok dengan mesin vortex. Setelah 30 detik pertama absorbansi campuran dibaca (A1) dalam spektrofotometer dan tiga menit berikutnya (A2).

HASIL

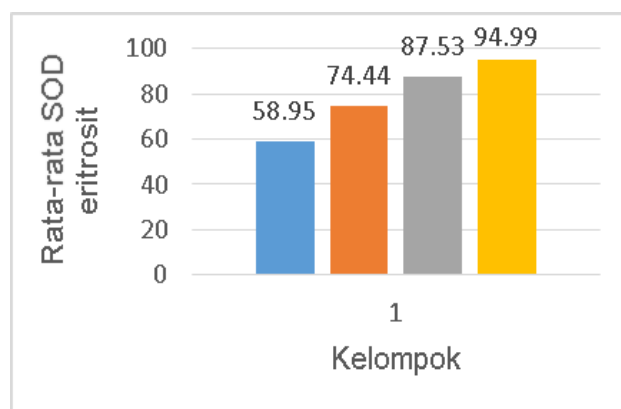
Hasil pengukuran berat badan, MDA plasma dan SOD eritrosit pada tiap kelompok dapat dilihat pada tabel 1. Diagram hasil pengukuran kadar MDA serta SOD dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.

Variabel	Kelompok			
	K1 x ± SD	K2 x ± SD	K3 x ± SD	K4 x ± SD
Berat badan (gram)	150.17 ± 0.983	157.67 ± 7.321	159.17 ± 9.411	152.50 ± 3.834
MDA (nmol/L)	32.83 ± 17.498	83.33 ± 33.963	44.17 ± 19.773	76.00 ± 12.329
SOD	58.95 ± 1.472	74.44 ± 1.682	87.53 ± 1.332	94.99 ± 0.635

Tabel 1. Hasil analisis deskripsi variabel penelitian



Gambar 1. Diagram kadar MDA plasma



Gambar 2. Diagram Rata-rata SOD eritrosit

Berdasarkan data Kadar MDA dan SOD sesudah perlakuan pada keempat kelompok, dilakukan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk. Hasil menunjukkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$), sehingga data dianalisis dengan uji Anova.

Berdasarkan hasil uji LSD pada tabel 4 menunjukkan bahwa adanya perbedaan pada setiap kelompok yang mempunyai perbedaan perlakuan. Kelompok A dan kelompok B mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,001$. Kelompok A dan kelompok C mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,391$. Kelompok A dan kelompok D mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,016$. Kelompok B dan kelompok C mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,007$.

Kelompok B dan kelompok D mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,221$. Sedangkan Kelompok C dan kelompok D mempunyai perbedaan signifikansi $p = 0,092$. Dari hasil pengukuran SOD eritrosit untuk keempat kelompok tidak ada perbedaan yang bermakna $p > 0.05$.

PERLAKUAN		Sig.
Kel. 1	Kel. 2	.001
	Kel. 3	.391
	Kel. 4	.016
Kel. 2	Kel. 3	.007
	Kel. 4	.221
Kel. 3	Kel. 4	.092

Tabel 2. Hasil Uji LSD MDA dari Setiap Perlakuan

DISKUSI

Berdasarkan data berat badan Tikus Putih (*Wistar Rattus Norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam batas normal dan homogen. Berdasarkan Federer, berat badan hewan coba yang digunakan untuk penelitian tidak boleh lebih dari 10% dan kurang dari 10%. Sampel hewan coba digunakan pada suatu populasi yang homogen.

Hasil pengukuran MDA pada serum atau plasma merupakan cerminan kerusakan plasma dari membran liver yang disekresikan ke dalam darah. Hasil kadar MDA menunjukkan nilai $p < 0,05$, sehingga menunjukan perbedaan yang bermakna antar keempat kelompok tersebut. Pada beberapa penelitian tentang pemberian GSH pada tikus putih yang terpapar PCT sehingga mengalami hepatotoksik menunjukkan

hasil bahwa GSH mampu mengontrol dan menurunkan MDA plasma pada liver tikus [14].

Pemberian GSH eksogen tidak memberikan pengaruh secara bermakna terhadap peningkatan SOD plasma pada tikus putih yang terpapar parasetamol dosis tinggi. Hal ini dikarenakan SOD eritrosit dipengaruhi faktor-faktor jaringan yang lain seperti hati, otak, limfa, sehingga SOD eritrosit kurang mencerminkan hasil pemberian GSH eksogen. Selain itu pula, hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor lain seperti kondisi tikus yang mengalami stres pada saat dilakukan percobaan karena dalam satu kandang ada beberapa hewan coba, pengambilan darah pada hewan coba yang diambil dari jantung dapat mempengaruhi hasil dari penentuan kadar SOD, hal tersebut dapat disebabkan oleh cairan intrasel yang dapat ikut terambil.

KESIMPULAN

Kesimpulan pada penelitian ini ialah pemberian antioksidan Glutation eksogen dapat menurunkan MDA plasma pada kelompok tikus putih yang terpapar parasetamol dengan menggunakan beberapa perlakuan yang berbeda. Pemberian antioksidan Glutation eksogen tidak meningkatkan SOD plasma pada liver tikus putih yang terpapar parasetamol dengan menggunakan beberapa perlakuan berbeda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Choesnan Effendi, dr., AIF., AIFO., Karma Budiman, Drs., Apt., MM., atas kerjasamanya selama penelitian ini, serta atas bantuannya sehingga penelitian ini dapat selesai dengan baik.

PENDANAAN

Penulis dalam penelitian ini didanai oleh institusi Universitas Hang Tuah Surabaya.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis tidak memiliki konflik kepentingan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Galal RM, Zaki HF, El-Nasr MM, Agha AM, 2012. Potential protective effect of honey against paracetamol induced hepatotoxicity. Arch Iran Med ; 15(11): 674-680
2. Pompella, A, Visvikis, A, Paolicchi, A, Tata, V, and Casini, AF, 2003. "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist". Biochemical Pharmacology 66 (8): 1499–503
3. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr ;134(3):489-92
4. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G, 2001. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. Clin Che ;47(8):1467-9.
5. Kerkick C and Willoughby D, 2005. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2:38-44.
6. Volodymyr I L, 2012. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. Journal of Amino Acids. Article Review.
7. Langseth L, 1994. Oxidants and Antioxidants: Some Basic Concepts. Dalam: Bracco U, Jardine NJ (Eds). Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention. Belgium: International Life Science Institute; p. 1-4
8. Suryohudoyo P, 2000. Oksidan, Antioksidan dan Radikal bebas. Dalam: Ilmu Kedokteran Molekuler. Kapita Selekta. Jakarta: Sagung Seto.p. 31-46
9. Powers SK. and Jackson MJ, 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. Physiol Rev 88, October : 1243–1276
10. Halliwell B, Gutteridge J, 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
11. Higgins, J.E; Kleinbaum, A.P. 1985. Design Metodology for Randomized ClinicalTrials,part II of the Basis of Randomized Clinical Trials with an Emphasis on Contraceptic Research. NewYork:FamilyHealthInternational.
12. Indriani. 2013. Populasi, Sampel, Dan Teknik Sampling. Universitas Negeri Semarang
13. Beeton, Christine, Garcia, Ardiana, Chandy, K., George, 2007. 'Drawing Blood from Rats through the Saphenous Vein and by Cardiac Puncture'. J Vis Exp.
14. Adeyemi OS dan Orekoya BT, 2014. Lipid Profile and Oxidative Stress Markers in Wistar Rats following Oral and Repeated Exposure to Fijk Herbal Mixture. Journal of Toxicology.