

TOKSISITAS ASETAMINOFEN PADA KHAMIR *Candida tropicalis*

Heddy Julistiono

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI
Cibinong Science Center
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911-Indonesia
Email: heddy_j@yahoo.com

ABSTRACT

Use of the yeast for cell based method to do a screening substances having anti-oxidant property is considered to be simpler and cheaper. In order to develop yeast *Candida tropicalis* as a tool for evaluation of anti- or pro-oxidant property of substances in cell level, toxicity of an analgesic drug acetaminophen in the yeast had been preliminary studied. Incubation of yeast cell suspension in presence of 0.3% acetaminophen for 2 hours significantly decreased cell viability. Malon dialdehyde, a biochemical marker for cell oxidative damage, increased. Acetaminophen of 0.1% or 0.039% decreased when added in cell yeast suspension or supernatant respectively for 1 hour indicating drug metabolism by cellular and extracellular enzymes. The data indicated that toxicity of the drug in the yeast could be compared to that in mammalian cell where the drug was metabolized by cytochrome P-450 or peroxidase and followed with oxidative stress in cells caused by metabolite byproduct. Toxicity of the drug in the yeast may be in relation with formation of reactive oxygen species. These preliminary data used the yeast for screening antioxidant property of substances against acetaminophen toxicity.

Key words: acetaminophen, *Candida tropicalis*, model cell, oxidative stress

PENGANTAR

Untuk mengetahui sifat senyawa yang diduga dapat mengakibatkan stres oksidasi di tingkat sel dapat dilakukan percobaan yang menggunakan satu jenis sel. Sebagai contoh, khamir *S. cerevisiae* merupakan sel model yang sangat berguna untuk mempelajari proses di tingkat molekular yang melatarbelakangi terjadinya bermacam kematian sel dari organisme tingkat tinggi seperti hewan dan manusia. Dibanding penggunaan sel mamalia, penelitian dengan sel khamir tidak memerlukan biaya yang mahal dan lebih sederhana. *C. tropicalis* LIPIMC 0065 yang diisolasi dari tanah daerah Cepu Indonesia (Saono and Gandjar, 1974) merupakan khamir yang memiliki aktivitas enzim yang berhubungan dengan proses antioksidasi (Yulineri dan Julistiono, 2003; Julistiono, 2006a) dan dapat digunakan untuk mempelajari sifat prooksidasi dan antioksidasi dari vitamin C (Julistiono, 2006b).

Paracetamol (acetaminophen, N-acetyl-*p*-aminophenol) merupakan salah satu senyawa analgesik dan antipiretik yang banyak digunakan. Walaupun obat ini dianggap aman, namun pada kondisi tertentu dapat bersifat racun (Prescott, 1983). Keracunan pada sel mamalia merupakan akibat teroksidasinya paracetamol menjadi N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), suatu senyawa intermediate yang reaktif yang dikatalisis oleh enzim sitokrom P450 (P450). Senyawa ini mengakibatkan menurunnya glutathion

yang pada proses selanjutnya akan mengakibatkan stres oksidasi sel (Vermeulen *et al.*, 1992).

Pada penelitian ini diamati kematian sel khamir akibat inkubasi dengan asetaminofen dan hubungannya dengan kemampuan sel memetabolisme obat tersebut. Kemampuan khamir untuk memetabolisme obat diamati dengan berkurangnya konsentrasi obat tersebut. Metabolisme asetaminofen diamati baik pada suspensi sel maupun supernatan. Kemampuan suspensi sel untuk menurunkan konsentrasi asetaminofen mencerminkan kemampuan enzim terlarut (peroksidase) dan membrane (sitokrom P-450) untuk memetabolisme obat. Sedang kemampuan supernatan menurunkan konsentrasi obat mencerminkan adanya enzim terlarut yang mampu memetabolisme obat tersebut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Khamir *Candida tropicalis*

Biakan khamir yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida tropicalis* LIPIMC 0065 yang merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI, diisolasi dari tanah di Cepu, Jawa Tengah yang terkontaminasi dengan limbah bahan bakar minyak (Saono and Gandjar, 1974).

Media pertumbuhan khamir

Media pertumbuhan khamir adalah media mengandung gliserol sebagai sumber karbon dan energi (Julistiono, 2006a; Julistiono 2006b). Gliserol digunakan sebagai sumber C dan energi karena gliserol tidak terfermentasi oleh khamir menghasilkan etanol (De Winde *et al.*, 1997). Dengan demikian, selama pertumbuhan tidak terdapat etanol yang bersifat prooksidan. Dalam 1 l media cair gliserol mengandung 2,4 ml gliserol, 1,3 g KH_2PO_4 , 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g ekstrak khamir, 4 g bakto pepton, dan 1 ml larutan X (5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g MnSO_4 , 2,8 g CuSO_4 , dan 250 ml akuades). Semua bahan dilarutkan, kemudian media dipindahkan sebanyak 100 ml ke dalam labu erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada 121°C , 150 atm.

Media agar untuk menghitung viabilitas khamir

Media agar yang digunakan untuk pertumbuhan khamir adalah sebagai berikut (Julistiono, 2006). Dalam 1 l media mengandung 3,0 g ekstrak khamir, 5,0 g bakto pepton, 20 g bakto agar, 10 g glukosa, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan akuades sampai volumenya 1 l.

Penumbuhan khamir

Khamir ditumbuhkan pada media cair gliserol pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Khamir yang akan diuji diperoleh dari biak berumur 2 hari, pada saat fase stasioner. Kepadatan sel khamir yang hidup dihitung dengan metoda *pour plate* pada media padat. Satuan jumlah sel yang hidup adalah CFU (*colony forming unit*) per ml. Kandungan protein supernatant diukur menggunakan metode Bradford (1976) dengan menggunakan serum albumin bovine sebagai standar protein.

Perlakuan

Kultur khamir sebanyak 200 ml berumur 48 jam dipanen dan disentrifugasi 8000 g selama 10 menit, dicuci dengan akuades, dan disentrifugasi ulang sehingga diperoleh pelet, ditambah akuades sampai 15 ml. Suspensi sel sebanyak 1 ml diberi asetaminofen (Kimia Farma) atau tidak (kontrol). Setelah inkubasi selama 2 jam, sel ditumbuhkan pada media agar dengan suhu 30°C . Kandungan asetaminofen diukur sebelum dan sesudah inkubasi. Untuk mengetahui aktivitas protein ekstraselular dalam mengurai asetaminofen, inkubasi serupa selama 1 jam dilakukan pada supernatan hasil hasil sentrifugasi 10000 g selama 10 menit. Data merupakan hasil dari 3 ulangan independen dan dianalisis dengan ANOVA menggunakan uji Duncan taraf 5%.

Pengukuran Peroksidasi lipida

Peroksidasi lipida diukur dengan mengukur malon dialdehida (MDA) yang terbentuk, mengacu pada metoda (Ray *et al.*, 2002) yang dimodifikasi. Setelah 1 jam inkubasi, suspensi ditambah 0,8 ml TCA 75%, digojog merata lalu ditambah 1,5 ml TBA 0,67% dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian dipanaskan pada suhu 95°C . Suspensi didinginkan dan disentrifugasi kecepatan tinggi 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibaca dengan spektrofotometer pada 532 nm. Konsentrasi MDA ditentukan dengan membandingkannya dengan kurva MDA (1,1, 3,3-Tetraethoxypropane, Sigma) standar.

Pengukuran acetaminofen

Kandungan asetaminofen dalam larutan diukur menggunakan HPLC Shimadzu LC 20 AB, kolom C18 Supelco Ascentis, fase gerak metanol 80% (v/v), dan air 20% (v/v), kecepatan alir 0,5 ml/menit, suhu oven 40°C , panjang gelombang 254 nm.

HASIL

Pengaruh asetaminofen terhadap viabilitas sel disajikan pada Tabel 1; pengaruh asetaminofen terhadap lipida khamir teroksidasi disajikan pada Tabel 2; kemampuan suspensi sel khamir memetabolisme asetaminofen tersaji pada Tabel 3; sedang kemampuan supernatan melakukan metabolisme asetaminofen tersaji pada Tabel 4.

Tabel 1. Pengaruh asetaminofen terhadap viabilitas khamir

Perlakuan	Viabilitas (10^6 CFU/ml)
Asetaminofen 0%	224,1 ± 11,3 a
Asetaminofen 0,3%	143,3 ± 6,45 b

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 2. Pengaruh asetaminofen terhadap lipida khamir terperoksidasi

Perlakuan	Lipida terperoksidasi (pmol malon dialdehida/ 10^6 CFU)
Asetaminofen 0%	3,52 ± 0,18 a
Asetaminofen 0,3%	7,50 ± 0,02 b

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 3. Pengaruh inkubasi terhadap konsentrasi asetaminofen pada suspensi sel

Perlakuan	Konsentrasi asetaminofen (%)
Asetaminofen 0 jam	0,3 ± 0,03 a
Asetaminofen 2 jam	0,12 ± 0,01 b

Keterangan: kepadatan suspensi sel adalah: 695,1 CFU/ml; angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

Tabel 4. Pengaruh inkubasi terhadap konsentrasi asetaminofen pada protein ekstraselular

Perlakuan	Konsentrasi asetaminofen (%)
Asetaminofen 0 jam	0,039 ± 0,002 a
Asetaminofen 1 jam	0,003 ± 0,001 b

Keterangan: konsentrasi protein ekstraselular adalah 0,01 µg/ml; angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%.

PEMBAHASAN

Dari data terlihat bahwa asetaminofen mengakibatkan kematian sel khamir (Tabel 1) sedang mekanisme keracunan obat tersebut ditandai dengan teroksidasinya komponen sel (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa asetaminofen mengakibatkan stress oksidasi pada sel khamir dan mengakibatkan kematian seperti yang dilaporkan oleh peneliti untuk kasus sel mamalia (Vermeulen *et al.*, 1992).

Dalam penelitian ini, walau tidak dilakukan purifikasi enzim yang bertanggung jawab pada metabolisme asetaminofen, namun ditunjukkan bahwa sel khamir mampu mengurai obat tersebut ditandai dengan menurunnya kadar obat pada suspensi sel (Tabel 3) juga pada supernatan atau protein ekstraselular (Tabel 4). Enzim yang terdapat pada sel yang dilaporkan bertanggung jawab pada metabolisme asetaminofen adalah sitokrom P-450 dan peroxidase. Sedang enzim yang terdapat pada supernatant hanya peroxidase, mengingat sitokrome P-450 adalah protein yang terdapat pada membrane sitoplasmik dan aktivitasnya tergantung pada enzim membranair dan *soluble* (Gonzales, 2005). Sistem metabolisme senyawa asing pada sel alga uniselular yang mirip pada sistem mamalia ini juga ditunjukkan oleh Julistiono dan Briand (1992). Selama ini, belum dilaporkan adanya system enzim P-450 yang terdapat pada ekstraselular mikroba. Dari penelitian ini, diduga bahwa di kedua enzim tersebut mungkin terdapat sel khamir dan aktivitasnya kemungkinan besar mampu mengurai asetaminofen. Stres oksidasi pada sel tikus yang diakibatkan oleh paracetamol seperti juga oleh senyawa yang bersifat

prooksidan lainnya dapat diamati dari peningkatan lipida terperoksidasi (Ojo *et al.*, 2006).

Selain sitokrom P-450 enzim yang mampu mengurai asetaminofen dan menghasilkan metabolit yang memiliki radikal bebas adalah peroxidase (Heinecke *et al.*, 1993). Keracunan paracetamol juga dapat terjadi karena stres oksidasi yang diawali terbentuknya Phenoxyl Padical yang dikatalisis oleh enzim peroksidase telah ditunjukkan oleh Kapiotis *et al.* (1997).

Dari pemilihan ini adalah sel khamir *C. tropicalis* dapat mengalami keracunan oleh asetaminofen akibat stres oksidasi yang berhubungan dengan metabolisme obat tersebut oleh enzim selular maupun yang mampu keluar sel (ekstraselular). Sifat ini dapat mendukung penggunaan khamir untuk skrining penemuan bahan penawar racun akibat penggunaan asetaminofen yang berlebihan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh proyek "Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi Mikroba untuk Pengembangan Koleksi LIPI MC Penunjang Penelitian Dasar", APBN tahun 2006. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Antiokhia Risnawati, Ernawati, dan Rini atas bantuan teknisnya.

KEPUSTAKAAN

- Bradford M, 1976. A rapid & sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyst. Biochem.* 72: 248–252.
- Briand J, Julistiono H, Beaune P, Flinois J P, Dewaziers I, Leroux J P, 1993. *Presence Of Proteins Recognized By Mammalian Cytochrome-P-450 Antibodies In Euglena gracilis.* *Biochimica Et Biophysica Acta* 1203:199–204.
- De Winde JH, Thevelein JM, and Winderickx J, 1997. From feast to famine: adaptation to nutrient depletion in yeast. *In "Yeast stress respons" (S Hofmann and W H Mager, eds.)*. pp 1–52.
- Gonzales FJ, 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research* 569:101–110.
- Heinecke JW, Li W, Daehnke HL, Goldstein JA, 1993. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem.* 268:4069–4077.
- Briand J and Julistiono H, 1992. Microsomal Ethanol-Oxidizing System in *Euglena gracilis*. Similarities between *Euglena* and Mammalian Cell Systems. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 747–755.
- Julistiono H, 2006a. Superoxide Dismutase and Ethanol Resistance by Sodium Chloride and Lead in Yeast *Candida sp.* Y390. *J. Biol. Indonesia* 4: 1–7.

- Julistiono H, 2006b. Respons Oksidatif Khamir *Candida* sp. Y390 Terhadap Antioksidan Vitamin C (Oxidative Response of Yeast *Candida* sp. Y390 to an Antioxidant Vitamin C). *Gakuryoku*. XII:166–169.
- Kapiotis SG, Sengoelge M, Hermann I Held, C Seelos, B M K Gmeiner, 1997. Paracetamol Catalyzes Myeloperoxidase-Initiated Lipid Oxidation in LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17:2855–2860.
- Ojo OO, Kabutu FR, Bello M, and Babayo U, 2006. Inhibition of paracetamol-induced oxidative stress in rats by extracts of lemongrass (*Cymbropogon citratus*) and green tea (*Camellia sinensis*) in rats. *African Journal of Biotechnology* 5: 1227–1232.
- Prescott LF, 1983. The treatment of acetaminophen poisoning. *Drugs* 25: 290–314.
- Ray A, SR Chaudhuri, Majumdar B, Bandyopadhyay SK, 2002. Antioxidant activity of ethanol extract of rhizome of *Picrorhiza Kurroa* on indomethacin induced gastric ulcer during healing. *Indian J Clin Biochem*. 17: 44–51.
- Saono S and Gandjar I, 1974. Hydrocarbon-utilizing soil yeasts from oil fields in Tjepu region (central java), Indonesia. *Annales Bogorienses* V: 123–129.
- Vermeulen NPE, Bessems JGM, Van de streat R, 1992. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism based prevention. *Drug Metab Rev*. 24: 367–407.
- Yulineri T dan Julistiono H, 2003. Penggunaan Keragaman Khamir berdasarkan Keberadaan enzim superoksid dismutasenya untuk bioesai stres oksidatif. *Berkala Penelitian Hayati*. 8:49–51.