

EFEK PENAMBAHAN GLUTATHIONE
TERHADAP DAYA TAHAN *Shizosaccharomyces*
pombe YANG DIIRADIASI DALAM N₂, N₂O DAN O₂

Nikham dan Tamikaze Kume

**EFEK PENAMBAHAN GLUTATHIONE TERHADAP DAYA TAHAN
Schizosaccharomyces pombe YANG DIIRADIASI DALAM N₂, N₂O DAN O₂**

Nikham* dan Tamikaze Kume**

*Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN Jakarta

**Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, JAERI Jepang

ABSTRAK

EFEK PENAMBAHAN GLUTATHIONE TERHADAP DAYA TAHAN *Schizosaccharomyces pombe* YANG DIIRADIASI DALAM N₂, N₂O DAN O₂. Telah dilakukan penelitian efek radiasi sinar gamma Co⁶⁰ dan penambahan *glutathione* terhadap 3 strain khamir yaitu *S. pombe* MN55, MN72 dan L972h yang selama diiradiasi dialiri dengan N₂, N₂O dan O₂. Tujuan ingin mengetahui efek radiasi daya tahan 3 strain khamir dan membuktikan apakah *glutathione* mempunyai efek proteksi atau tidak terhadap sampel yang diiradiasi. Sampel yang dialiri N₂, N₂O dan kontrolnya diiradiasi pada sinar gamma pada dosis 0 – 2, 85 kGy dan yang dialiri O₂ diiradiasi pada dosis 0 – 2,06 kGy, dengan laju dosis 5 kGy/jam. Setelah diiradiasi sampel dibiakkan pada media *Yeast Peptone Glucose Agar* dan diinkubasi pada suhu 30 ± 2 °C selama 3 hari. Koloni yang tumbuh dihitung, datanya dipakai untuk membuat kurva dan menentukan nilai D₁₀. Hasilnya menunjukkan bahwa nilai D₁₀ sampel baik ditambah *glutathione* maupun tidak yang diiradiasi dengan dialiri N₂ lebih tinggi daripada nilai D₁₀ sampel yang dialiri N₂O dan O₂. Namun tidak ada perbedaan nyata antara nilai D₁₀ sampel baik yang ditambah *glutathione* maupun tidak, ini membuktikan bahwa *glutathione* sedikit mempunyai efek proteksi terhadap strain khamir yang diiradiasi.

Kata kunci ; sinar gamma, *glutathione*, *S. pombe*, N₂, N₂O, O₂, nilai D₁₀

ABSTRACT

EFFECTS OF GLUTATHIONE ADDITION ON THE RESISTENCE OF *Schizosaccharomyces pombe* WHICH IRRADIATED IN N₂, N₂O, O₂. The investigation of the effect of glutathione addition onto radiosensitivity of 3 strain yeasts are *S. pombe* MN55, MN72 and L972h in the N₂, N₂O, O₂ condition have been done. The objective of the research is want to know insofar the irradiation effect on resistance of the yeast and to prove whether glutathione has radiation protective effect or not to these strains. The suspension of the sample in O₂ were irradiated at doses 0 to 2.06 kGy, in N₂, N₂O, and the control at doses 0 to 2.86 kGy. After irradiated, the samples were cultured on the YEPGA medium and incubated at 30 ± °C for 3 days. After 3 days the surviving colonies were calculated, then the prepared data's to make curve and to determine the D₁₀ value. The results show that the D₁₀ values of the sample either without or with glutathione addition, which irradiated in N₂ are higher than that D₁₀ value of the sample, which irradiated in N₂O and O₂. Nevertheless D₁₀ values of the sample either without or with glutathione addition were no significant differences, so it can be proved that glutathione has little protective effect on the irradiated of these strains.

Key words ; gamma rays, glutathione, *S. pombe*, N₂, N₂O, O₂ and D₁₀ value

PENDAHULUAN

Glutathione, γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycine (GSH) atau $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ yaitu tiol nonprotein utama yang banyak terdapat dalam bakteri Gram-negatif (1) dan organisme tingkat tinggi termasuk manusia (2 - 4). GSH ditemukan dalam sel pada konsentrasi hingga 10 mM, sebagian besar dalam bentuk tereduksi. GSH juga terlibat dalam aktivasi mutagen tertentu misalnya *nitrosoguanidine*, *nitrosamide*, *nitrosocarbamate*, *neocarsinostatin* dan beberapa senyawa dihalogen (5). GSH seluler dilaporkan dapat meningkatkan efek oksigen terhadap kerusakan radiasi dalam *Escherichia coli* (6). GSH nampaknya merupakan komponen utama dalam interaksi antara produk radiasi dan sel. Suatu sel yang tidak mampu mensintesa GSH tidak dapat diproteksi terhadap efek kematian dari radiasi pengion. Selain itu laporan lain menyatakan bahwa GSH dalam *Escherichia coli* tidak mempengaruhi daya tahannya terhadap radiasi gamma (7). Pustaka lain menyatakan bahwa *Glutathione* dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif seperti disebabkan oleh H_2O_2 dan radiasi pengion, mempertahankan status protein sulfhidril, kompleksasi senyawa reaktif *xenobiotic* atau *endogenous*, membantu dalam detoksifikasi dan atau ekskresinya serta sebagai transpor asam-asam amino γ *glutamyl* (8, 9). Oleh karena itu efek GSH pada kerusakan sel akibat radiasi belum jelas

S. pombe adalah salah satu tipe sel eukariotik yang paling sederhana. Sel ini mempunyai gen *housekeeping* minimal jumlahnya 700 dan ukuran *genome* paling kecil 14 Mb dan diasumsikan sebagai model sel manusia. Beberapa gen manusia umumnya diekspresikan dalam sel *S. pombe*. Sel ini relatif mudah dipelajari fungsi gennya dengan mengacau rekombinan homolog dan dengan mengintroduksi homolog manusia (10). Menurut beberapa pustaka ada tiga *strain* khamir yang menarik yaitu *S. pombe* MN55 yang tidak dapat menghasilkan GSH dan senyawa SH lain, *S. pombe* MN72 yang hanya dapat menghasilkan GSH dan *S. pombe* L972h⁻ dapat menghasilkan keduanya baik GSH maupun senyawa SH (11).

Sampel yang diiradiasi dalam kondisi basah, akan mengalami efek radiasi langsung dan tidak langsung. Efek radiasi tidak langsung pada sampel dalam kondisi basah yang dialiri N_2 , akan menghasilkan produk radiolisis berupa radikal e_{aq}^- dan OH, yang dialiri N_2O menghasilkan radikal OH dan yang dialiri O_2 , menghasilkan radikal OH dan H serta molekul H_2O_2 . Dengan adanya O_2 dan N_2O selama iradiasi, radikal bebas e_{aq}^- dapat bereaksi O_2 dan juga N_2O sehingga menghasilkan radikal O_2^- (12, 13). Spesies kimia ini

dapat bereaksi dengan DNA baik langsung maupun setelah terjadi transformasi logam dengan cara katalisasi ke dalam sel, akibatnya dapat menghasilkan modifikasi DNA. Ada sekitar 100 jenis modifikasi DNA telah diidentifikasi setelah dipaparkan pada radiasi pengion. Modifikasi ini meliputi kerusakan *strand* tunggal dan *strand* ganda, modifikasi basa dan kerikatan silang. Sedangkan efek langsung dari radiasi pada sampel akan menyebabkan eksitasi dan ionisasi pada DNA sehingga terjadi kerusakan seperti alkilasi, hidrasi, kerusakan pada rantai tunggal atau ganda, perubahan bentuk, terjadi ikatan silang *inter-strand*, ikatan silang protein-DNA dan kerusakan karena pirimidin dimmer (14, 15). Akibat timbulnya modifikasi dan kerusakan-kerusakan pada DNA tersebut dapat menyebabkan kematian sel (10, 16).

Adapun tujuan penelitian yaitu ingin mengetahui seberapa jauh efek iradiasi terhadap daya tahan *strain S. pombe* yang selama radiasi dialiri dengan N_2 , N_2O dan O_2 dan untuk membuktikan apakah *glutathione* mempunyai efek proteksi atau tidak terhadap sel khamir diiradiasi dengan sinar gamma.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian. Sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah khamir *Schizosaccharomyces pombe strain* MN55, MN72 dan L972h. Untuk pembiakan *strain* ini digunakan media *Yeast Peptone Dextrose Broth (YPDB)* dan untuk pembiakan sel setelah diiradiasi dipakai media *Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)*, buatan *Merck*. Sebagai cairan untuk membuat suspensi sel digunakan buffer fosfat.

Persiapan Sampel. *Strain Schizosaccharomyces pombe* MN55, MN72 dan L972h dibiakan dalam tabung reaksi yang berisi media YPDB dan diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 40 jami. Selanjutnya sel dipanen dengan cara dicuci dengan larutan *buffer* dan sambil dipusingkan dengan alat "*HITACHI CENTRIFUGE*" pada kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit, setelah bersih suspensi diatur konsentrasinya sekitar 10^8 sel per ml.

Iradiasi Sampel. Suspensi masing-masing *strain* ditambah dengan 4.2 mM *glutathione* dan kemudian dikocok untuk mendapatkan sample yang homogen. Suspensi dibagi dalam empat tabung, siap untuk diiradiasi dengan sinar gamma, yang satu sebagai kontrol, yang lainnya untuk dialiri N_2 , N_2O dan O_2 . Suspensi yang dialiri N_2 , N_2O dan kontrolnya (tanpa dialiri N_2 , N_2O dan O_2) diiradiasi pada dosis 0 – 2,85 kGy, sedang yang dialiri O_2 diiradiasi pada dosis 0 – 2,06 kGy serta laju dosis 5 kGy/jam.

Pengamatan. Sampel yang telah diiradiasi, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi aquades dengan *tween* steril, lalu diencerkan, dan pada pengenceran tertentu suspensi sampel sekitar 0,2 ml dibiakkan pada media YPGA. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari. Koloni yang tumbuh dihitung data yang diperoleh ditransformasikan dalam kurva dan dari kurva ini dapat ditentukan nilai D_{10} nya atau dari data tersebut dapat juga dengan bantuan program *basic* dalam komputer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek penambahan *glutathione* terhadap sensitivitas strain *S. pombe* MN55 yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N_2 , N_2O dan O_2 dapat dilihat pada Gambar 1. Kurva berbentuk *shouldered* dan terlihat bahwa efek iradiasi sinar gamma pada khamir yang dialiri O_2 jauh lebih nyata dibandingkan dengan yang dialiri N_2 dan N_2O . Peranan O_2 dalam hal ini dapat mempercepat kerusakan DNA. Di samping itu radiasi dalam kondisi basah dapat menimbulkan radiolisis dari bagian molekul air dengan pembentukan radikal hidrogen dan hidroksil yang sangat reaktif (17). Jadi keadaan ini akan mempercepat kerusakan DNA khamir tersebut atau dengan kata lain peran O_2 dalam hal ini sebagai *inhibitor* perbaikan diri DNA yang rusak. Data hasil penelitian dapat dilihat bahwa efek iradiasi dosis 2,06 kGy pada sampel yang dialiri O_2 dapat menurunkan daya tahannya sekitar 3 *log cycle* (desimal) sedangkan yang dialiri N_2O dan kontrolnya pada dosis 2,85 kGy lebih dari 1 *log cycle* serta yang dialiri N_2 kurang dari 1 *log cycle*. Penurunan ini tidak berbeda nyata dengan sampel yang ditambah *glutathione*. Jika dihitung nilai D_{10} nya dapat diperoleh bahwa sampel yang ditambah *glutathione* lalu diiradiasi dengan dialiri O_2 adalah 0,6 kGy dan tanpa *glutathione* 0,7 kGy. Sedangkan sampel yang ditambah *glutathione* lalu dialiri N_2O adalah 1,4 kGy dan tanpa *glutathione* 1,6 kGy. Sampel yang ditambah *glutathione* lalu dialiri N_2 adalah 2,9 kGy dan tanpa *glutathione* 3,0 kGy serta kontrolnya 2,3 kGy. Penurunan daya tahan strain baik ditambah maupun tanpa *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri O_2 adalah 5 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N_2 dan 3 kali lipat kontrolnya.

Efek penambahan *glutathione* terhadap sensitivitas strain *S. pombe* MN72 yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N_2 , N_2O dan O_2 dapat dilihat pada Gambar 2. Dalam gambar dapat dilihat pula efek iradiasi pada dosis 2,06 kGy terhadap sampel baik tanpa maupun ditambah *glutathione* yang dialiri O_2 dapat menurunkan daya tahannya lebih

dari 3 *log cycle* dan pada dosis 2,86 yang dialiri N₂O dapat menurunkan daya tahan sekitar 3 *log cycle*, sedangkan yang dialiri N₂ dan kontrolnya lebih dari 1 *log cycle*. Jika dihitung nilai D₁₀, sampel ditambah *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 0,6 kGy dan yang tanpa *glutathione* 0,7 kGy. Sedangkan nilai D₁₀ sampel ditambah *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri N₂O adalah 0,8 kGy dan tanpa *glutathione* 1,1 kGy, serta sampel ditambah *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri N₂ adalah 2,2 kGy dan tanpa *glutathione* 2,3 kGy, dan kontrolnya adalah 1,7 kGy. Penurunan daya tahan strain baik ditambah maupun tanpa *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 4 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N₂ dan 3 kali lipat kontrolnya.

Efek penambahan *glutathione* terhadap sensitivitas strain *S. pombe* L972h⁻ yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N₂, N₂O dan O₂ dapat dilihat pada Gambar 3. Demikian pula dapat dilihat bahwa efek iradiasi pada dosis 2,06 kGy terhadap sampel ditambah *glutathione* baik yang dialiri O₂ maupun N₂O pada dosis 2,86 kGy dapat menurunkan daya tahan lebih dari 3 *log cycle* dan tanpa *glutathione* juga lebih dari 3 *log cycle*. Pada dosis 2,86 kGy terhadap sampel ditambah *glutathione* yang dialiri N₂ dan kontrolnya lebih dari 1,5 *log cycle*. Jika dihitung nilai D₁₀ nya diperoleh hasil bahwa sampel ditambah *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 0,4 kGy dan tanpa *glutathione* 0,5 kGy. Sedangkan sampel ditambah *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri N₂O adalah 0,7 kGy dan tanpa *glutathione* 0,8 kGy, serta sampel ditambah *glutathione* yang dialiri N₂ adalah 1,6 kGy dan tanpa *glutathione* 1,7 kGy dan kontrolnya 1,5 kGy. Dari data nilai D₁₀ sampel baik ditambah maupun tanpa *glutathione* selama diiradiasi dialiri N₂ lebih tinggi daripada sampel yang selama diiradiasi dialiri N₂O, O₂ dan kontrolnya. Hal ini terjadi karena N₂ merupakan gas *inert* yang tidak menimbulkan efek terhadap daya tahan *strain* khamir yang diiradiasi. Penurunan daya tahan strain baik ditambah maupun tanpa *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 3 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N₂ ataupun kontrolnya. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa iradiasi dalam kondisi O₂, ternyata lebih efektif untuk menurunkan daya tahan *strain* khamir tersebut. Di samping itu nilai D₁₀ sampel baik yang ditambah maupun tanpa *glutathione* tidak menunjukkan perbedaan nyata, hal ini dapat disimpulkan bahwa *glutathione* mempunyai sedikit proteksi terhadap *strain* khamir yang diiradiasi.

KESIMPULAN

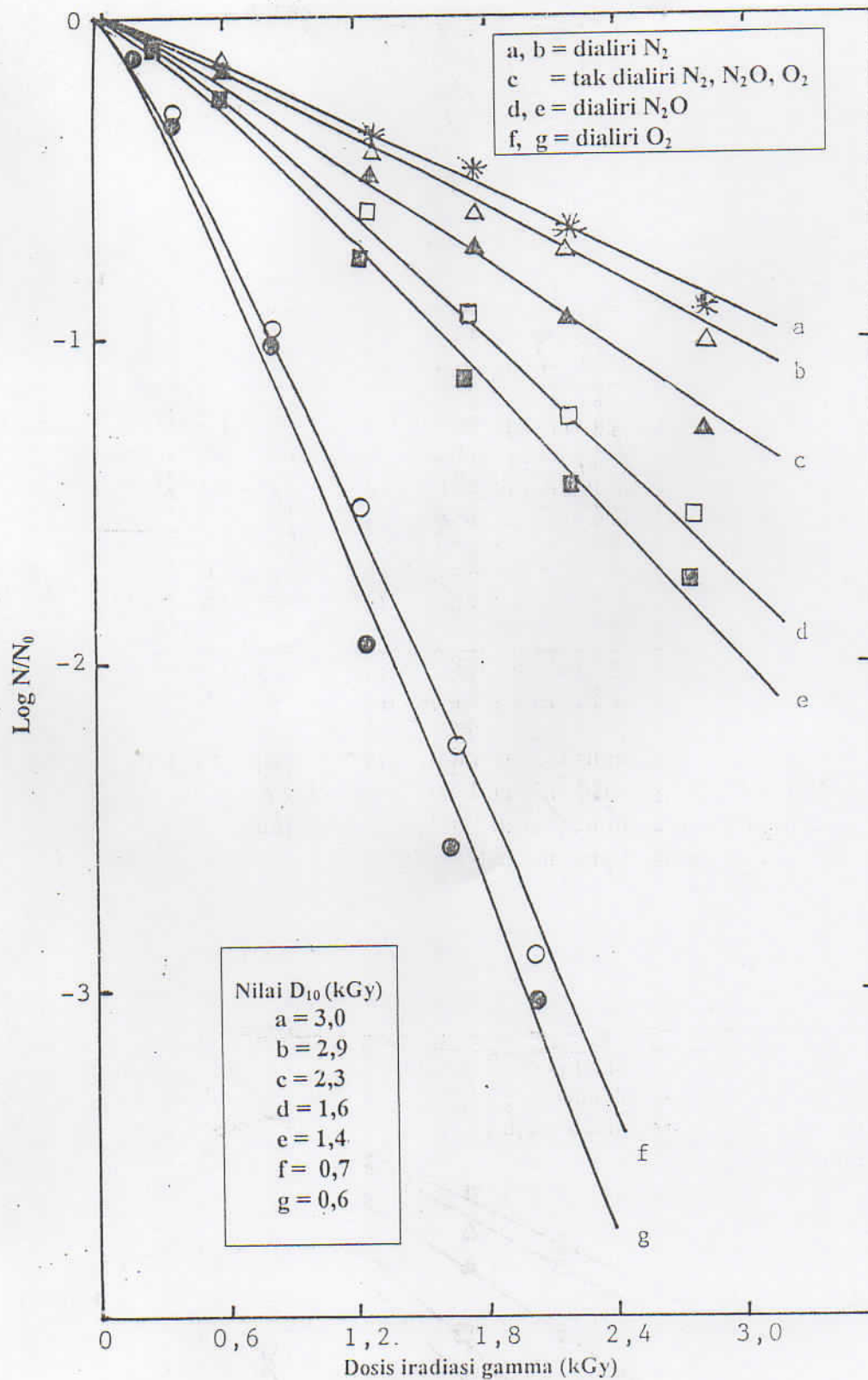
Dari data hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut;

1. Jika dilihat dari nilai D_{10} sampel baik ditambah maupun tanpa *glutathione* yang diiradiasi dengan dialiri N_2 lebih tinggi daripada nilai D_{10} sampel yang diiradiasi dengan dialiri N_2O dan O_2 . Atau dengan kata lain iradiasi dalam kondisi O_2 lebih efektif untuk menurunkan daya tahan *strain* khamir tersebut.
2. Dari data hasil penelitian ini ternyata tidak ada perbedaan nyata antara nilai D_{10} sampel baik yang ditambah maupun tanpa *glutathione*, sehingga dapat disimpulkan bahwa *glutathione* sedikit mempunyai proteksi terhadap *strain* khamir yang diiradiasi.

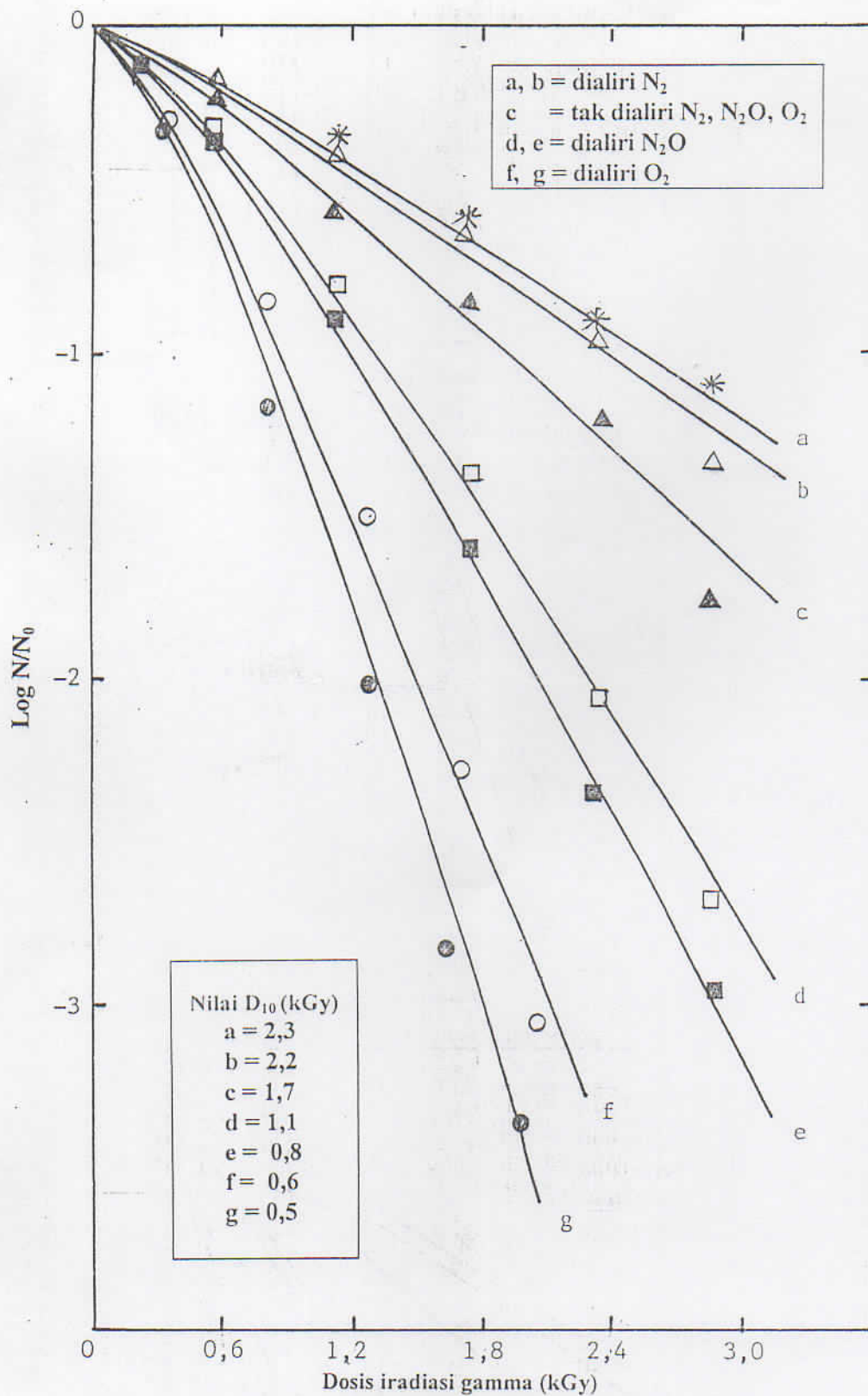
DAFTAR PUSTAKA

1. FAHEY, R. C., BROWN, W. C., ADAMS, W. B. and WORSHAM, M. B., Occurrence of glutathione in bacteria, *Journal Bacteriology* (1978) 133:1126-1129.
2. KOSOWER, M. S. and KOSOWER, E. M., The glutathione status of cells, *International Review Cytology* (1978) 54: 109 - 160.
3. FAHEY, R. C. and NEWTON, G. L. Occurrence of low molecular weight thiols in biological systems, In LARSSON, A., RRENIUS, S., HOLMGREN, A. and MANNERVIK, B. (Eds.) "Functions of glutathione: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects", Raven Press, New York (1983) 251 - 260.
4. MEISTER, A. and ANDERSON, M. E., Glutathione, *Annual Review Biochemistry* (1983) 52: 711 - 760.
5. OWENS, R. A. and HARTMAN, P. T. Glutathione; a protective agent in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* as measured by mutagenicity and by growth delay assay, *Environment Mutagenesis* (1986) 8: 569 - 575.
6. MORSE, M. L. and DAHL, R. H. Cellular glutathione is a key to the oxygen effect in radiation damage, *Nature* (1978) 271: 660 - 665.
7. GREENBERG, J. T. and DEMPSE, B. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H_2O_2 and gamma radiation, *Journal Bacteriology* (1986) 168: 1026 - 1032.
8. SIES, H. and WENDEL, A., Eds., *Function of Glutathione in Liver and Kidney*, Springer Verlag, New York (1978).
9. ARIAS, I. M. and JAKOBY, W. B., Eds., *Glutathione Metabolism and Function*, Raven Press, New York (1976).

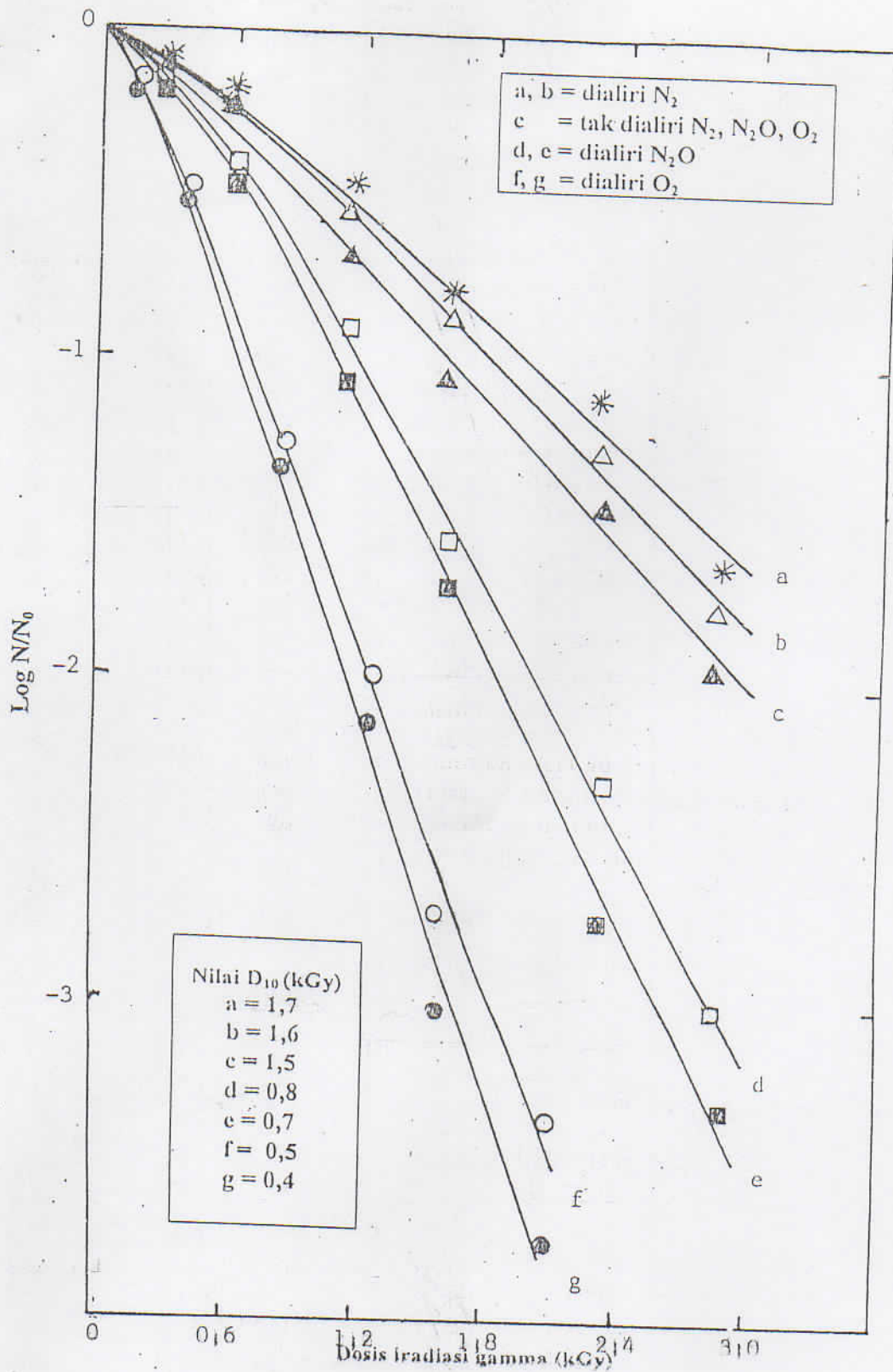
10. OZAWA, T., TATSUMI, K. and HORI, T. "Repair of ionising radiation induced base damage: role of DNA glycosylases", in Biodefence Mechanisms Against Environmental Stress, NIRS, Japan (1998) 107 - 123.
11. KNOX, W. E. The enzymes, BOYER, P. D., LARDY, H. and MAYRBACK, K. Eds. Vol. II, Academic Press, New York (1960).
12. JAMES, H. O. and DAVID, F. S. Principles of Radiation Chemistry, Edward Arnold (Publishers) Ltd, London (1979).
13. SPINKS, J. W. and WOODS, R. J. An Introduction to Radiation Chemistry, 2nd Ed., John & Sons, New York (1976).
14. GRICE, J. P. DNA breakage and rejoining in irradiated spore of *Clostridium botulinum* strains 62A and 23A, University Microfilm International, Ann Arbor, Michigan, USA (1983).
15. TALLENTIRE, A. Microbial responses to radiation, Departement of Pharmacy, University of Manchester, Oxford Road, Manchester, UK (1990).
16. SCHUBERT, J. and STEGEMEN, H. "Sterilization of microorganisms and enzymes by radiation-induced selective inorganic radical anion", Combination Processes in Food Radiation (Proc. Symp. Colombo, 1980), IAEA, Vienna (1981) 35 - 42.
17. NORMAN, W. D. and HENRY, M. R., Radiation Technology in Food, Agriculture and Biology, The Avi Publishing Company, Inc., Connecticut (1980) 202 pp.



Gambar 1. Efek penambahan *glutathione* terhadap daya tahan *S. pombe* MN 55 yang diiradiasi dalam kondisi N_2, N_2O dan O_2
 Keterangan; a, c, d, f = tanpa penambahan *glutathione*
 b, e, g = dengan penambahan *glutathione*



Gambar 2. Efek penambahan *glutathione* terhadap daya tahan *S. pombe* MN 72 yang diiradiasi dalam kondisi N_2, N_2O dan O_2
 Keterangan; a, c, d, f = tanpa penambahan *glutathione*
 b, c, g = dengan penambahan *glutathione*



Gambar 3. Efek penambahan *glutathione* terhadap daya tahan *S. pombe* L972h yang diiradiasi dalam kondisi N_2, N_2O dan O_2
 Keterangan; a, c, d, f = tanpa penambahan *glutathione*
 b, e, g = dengan penambahan *glutathione*