

PENGARUH ASAM ASKORBAT TERHADAP KADAR TIMBAL FETUS DAN AKTIVITAS ENZIM SITOKROM P450 1A1 (CYP1A1) PADA INDUK MENCIT TERINTOKSIKASI TIMBAL

Juliana Christyaningsih¹, Harianto Notopuro², Win Darmanto³, dan Diah Titik Mutiarawati¹

¹Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya

²Fakultas Kedokteran bagian Biokimia Universitas Airlangga

³Fakultas Sains & Teknologi Universitas Airlangga

E-mail: juliana_analis@yahoo.co.id

ABSTRACT

Lead contamination occurs through air pollution and industry, enter the body through respiratory and digestive tract. High lead content will accumulate and affect adversely the cognitive function, causing neuropsychological dysfunction, encephalopathy, hyperactivity and other problems in children, disrupt the central nervous system and the immune system of children as well. This experimental research was randomized control group post-test only design. The experiment used of 27 pregnant mice, divided into three groups: negative control group, which were given distilled water, positive control group were exposed only to lead and the third group were exposed to lead and administered ascorbic acid. 25 mg/kg/day/orally neutral lead acetate was given during gestation day 7 to 16, and ascorbic acid 64 mg/kg/day/orally, started on gestation day 9 to 16. Treatment group with ascorbic acid supplementation had the lowest CYP1A1 enzyme activity compared to positive and negative control groups. This results confirmed by the molecular weight of CYP1A1 enzyme ranges 53.7 to 59.2 kDa, and the western blotting test showed the same thin band both two groups. The lowest of the average lead concentration in the head of fetal mice was found on the group of mice that treated with vitamin C. Supplementation of ascorbic acid can protect the liver and fetuses, by suspected mechanism that ascorbic acid could chelate the lead and excrete it via urine.

Key words: ascorbic acid, CYP1A1 enzyme, lead of fetal head

PENGANTAR

Pencemaran logam di alam khususnya timbal semakin meningkat, hal ini dikarenakan salah satu sebab, yaitu bahan bakar bensin kita belum bebas timbal. Timbal sebagai tetraethyl lead (TEL) dalam bensin memiliki fungsi sebagai zat aditif untuk meningkatkan angka oktan secara ekonomis agar lebih efisien pada pembakaran gas dalam mesin sehingga efek knocking (ketukan)/terjadinya letupan-letupan pada mesin (engine knocking) dapat dihindari (Santi, 2001). Selain di atas, timbal juga terdapat pada bahan agrokimia (pupuk dan pestisida), bahan bakar minyak, pupuk organik, buangan limbah rumah tangga, industri, dan pertambangan (Charlena, 2004). Timbal mencemari udara, tanah dan air sehingga timbalpun terdapat dalam tanaman. Timbal sebagian besar diakumulasi oleh organ tanaman, yaitu daun, batang, akar, dan akar umbi-umbian sehingga timbal didapatkan dalam sayur-sayuran dan buah (Charlena, 2004) (Kohar *et al.*, 2005). Faktor yang berperan pada akumulasi logam dalam tanaman adalah konsentrasi logam dalam larutan tanah, pergerakan logam dari tanah ke permukaan akar, sistem transpor logam dari permukaan akar ke dalam akar dan translokasi dari akar ke tajuk tanaman (Alloway, 1995).

Penelitian yang dilakukan oleh Soehendro *et al.* (2005), memperlihatkan 84,4% anak sekolah di 9 sekolah dasar di Kecamatan Sidoarjo memiliki kadar timbal darah yang tinggi (melebihi 10 µg/dL, menurut WHO). Timbal yang masuk ke dalam tubuh dapat melalui saluran pernafasan dan pencernaan. Timbal yang masuk tubuh 95% akan diikat oleh eritrosit dan sebagian timbal plasma akan berdifusi ke jaringan lunak (sumsum tulang, sistem saraf, ginjal, dan hati) dan jaringan keras (tulang, kuku, rambut). Selebihnya, timbal akan disimpan di hati, ginjal, otak dan kulit serta bersifat toksik (Ardyanto, 2005). Kadar timbal yang tinggi akan terakumulasi dan berpengaruh buruk terhadap fungsi kognitif (Shih *et al.*, 2006), menyebabkan gangguan fungsi neuropsikologi (Surkan *et al.*, 2007), dan berhubungan dengan kehamilan abnormal (Falcon *et al.*, 2002), terjadinya anemia, gastroenteritis, ensefalopati (Darmono, 2001), hiperaktivitas, dan problema lain pada anak (Linder, 1992), serta mengganggu sistem saraf pusat.

Paparan timbal kronis pada hewan coba akan menginduksi aktivitas enzim sitokrom P450. Jika timbal ditambahkan pada inkubasi mikrosom, aktivitas NADPH-sitokrom P450 reduktase akan dihambat dan merupakan inhibitor metabolisme obat dengan substrat tertentu. Timbal

juga terbukti menghambat enzim-enzim tertentu dalam sintesis haem (Murray, 2006), memengaruhi aktivitas sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) yang merupakan salah satu bentuk isoform sitokrom P450 yang dilakukan oleh Traven *et al.* (2008) secara *in vitro* untuk polutan dalam sedimen dari laut termasuk timbal di antaranya menggunakan parameter enzim CYP1A.

Konsumsi kalsium yang tinggi dapat menekan pengambilan timbal oleh tubuh (Linder, 1992; Ettinger *et al.*, 2006), selain itu kadar timbal dalam tubuh dapat berkurang dengan pemberian khelator seperti *British Anti Lewisite* (BAL), *Calcium Natrium Ethylene Diamin Tetra Acetic* (CaNa-EDTA) dan penisilamin. BAL mengikat timbal dalam serum, darah dan cairan serebrospinal; CaNa-EDTA akan mengkhelat timbal dari jaringan lunak, tulang dan akan diekskresi melalui urin (Darmono, 2001). Vitamin C dipilih dalam penelitian ini karena dapat menurunkan kadar timbal dalam darah (Onunkwor *et al.*, 2004), dapat menurunkan kadar timbal dalam hepar dan darah mencit jantan (Christyaningsih, 2008) dan merupakan *chelating agent* non toksik yang dapat digunakan untuk pencegahan terhadap efek berlebihan dari paparan timbal. Sejauh ini pengaruh suplementasi vitamin C terhadap aktivitas enzim CYP1A1 dan kadar timbal fetus mencit yang terintoksikasi timbal belum dapat dijelaskan sehingga penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh asam askorbat terhadap kadar timbal fetus dan aktivitas enzim sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) pada induk mencit yang terintoksikasi timbal.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan Coba

Hewan coba *Mus musculus* (mencit) galur BALB/C, betina, dewasa, umur 10 minggu, bunting dengan usia gestasi 7 hari, berat badan 25–30 gram, sehat fisik dengan ciri-ciri bermata jernih, bulu mengkilap, gerak aktif, feses baik/tidak lembek, diperoleh dengan alokasi acak sebesar 9 ekor per kelompok sehingga diperlukan jumlah total 27 ekor mencit. Pembagian kelompok terdiri atas kelompok plasebo, kelompok kontrol positif (dengan paparan timbal saja), kelompok perlakuan (dengan paparan timbal dan asam askorbat).

Paparan timbal

Untuk membuat mencit terintoksikasi timbal pada kelompok kontrol positif dan perlakuan, mencit diberi

larutan Pb asetat secara per oral (sonde) dengan dosis 25 mg/kg BB/hari (hasil konversi dosis paparan sub akut pada manusia), dimulai saat gestasi hari ke-7 sampai ke-16.

Suplementasi Asam Askorbat

Asam Askorbat kadar 99,5% dari Fluka AG, *Chemische Fabril CH-9470 Busch SG*) dilarutkan dalam air suling dengan dosis 64 mg/kg BB/oral/hari/mencit (hasil konversi dosis 500 mg pada manusia), dimulai saat gestasi hari ke-7 sampai ke-16 hari.

Analisis Timbal Fetus

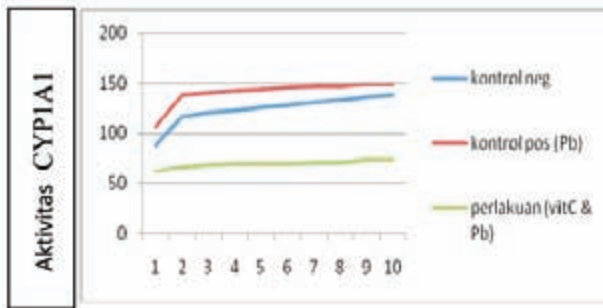
Pada gestasi hari ke-17, mencit diterminasi dengan cara *cervical dislocation* dan diambil fetusnya untuk analisis kadar timbal. Jaringan ditimbang lalu ditambahkan 1 ml asam sulfat pekat dan 5 ml campuran asam perklorat-asam nitrat (2:5), lalu dipanaskan dalam *microwave* sampai jernih dan didinginkan sampai suhu kamar. Larutan standar Pb 20 ppm ditambahkan sebanyak 5 ml dan aquades sampai volume 50 ml. Blanko disiapkan terbuat dari 1 ml asam sulfat pekat dan 5 ml campuran asam perklorat-asam nitrat (2:5). Absorbansi larutan dibaca dengan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) di Laboratorium Kimia Air, Makanan dan Minuman di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

Analisis aktivitas enzim CYP1A1 (Ikzus, Cat. No. 4260-500K)

Hepar induk mencit dicuci berulang dengan larutan KCl 0,15 M dingin, dihomogenkan pada suhu 0–4° C dengan larutan buffer ekstraksi jaringan dan inhibitor protease dan di-*centrifuge*. Homogenat diperiksa kadar protein dan aktivitas enzim CYP1A1 dengan pereaksi kit Ikzus metode *ethoxyresorufin-O-deethylase* (EROD), dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 573 nm. Keberadaan enzim CYP1A1 ditegaskan lagi dengan analisis Western Blotting dan SDS-PAGE untuk mengkonfirmasi bobot molekul CYP1A1. Analisis aktivitas enzim CYP1A1 dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Surabaya dan di Laboratorium Biomol di Universitas Brawijaya.

HASIL

Dari hasil penelitian didapatkan data rerata aktivitas enzim CYP1A1 yang diekstrak dari hepar induk mencit antarkelompok dalam pembacaan sampai menit ke-10.



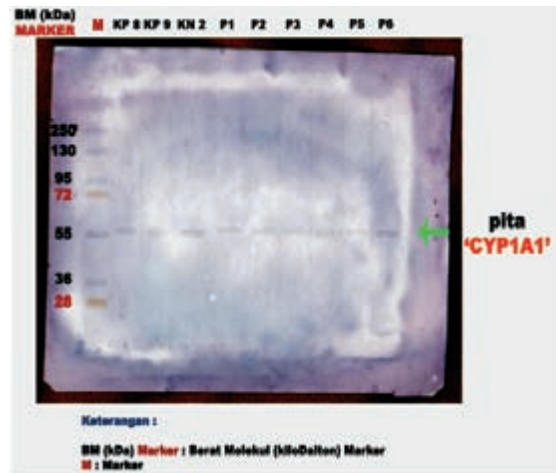
Gambar 1. Rerata aktivitas enzim CYP1A1 hepar induk mencit terhadap waktu (menit) antara kelompok kontrol negatif (plasebo); kelompok kontrol positif yang hanya dipapar timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 sampai ke-16 dan kelompok perlakuan dengan paparan timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 dan dosis asam askorbat 64 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-9 sampai ke-16, dengan metode EROD pada panjang gelombang 573 nm



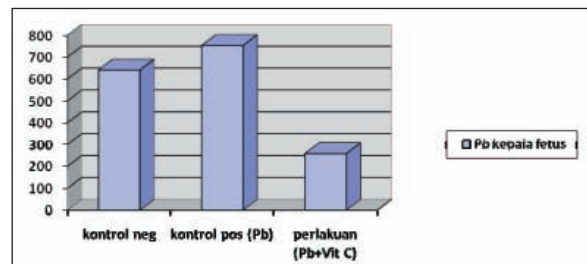
Gambar 2. Hasil elektroforesis SDS-PAGE, bahan hepar induk mencit, dengan keterangan: KN adalah kelompok kontrol negatif (plasebo); KP adalah kelompok kontrol positif yang hanya dipapar timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 sampai ke-16; P adalah kelompok perlakuan dengan paparan timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 dan dosis asam askorbat 64 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-9 sampai ke-16

Untuk mengidentifikasi keberadaan enzim CYP1A1 dalam hepar induk mencit dilakukan dengan metode *Western Blott* dengan menggunakan anti CYP1A1 sebagai *probe* dengan hasil sebagaimana tertera di Gambar 3.

Dari hasil analisis dengan menggunakan SDS-PAGE diperoleh nilai kisaran BM enzim CYP1A1 sebesar 53,7 sampai 54,2 kDa. Rerata kadar timbal dalam kepala fetus antar kelompok dapat disimak di Gambar 4.



Gambar 3. Hasil *Western Blott* bahan hepar induk mencit, yang dilabel dengan anti CYP1A1, dengan keterangan: KN adalah kelompok kontrol negatif (plasebo); KP adalah kelompok kontrol positif yang hanya dipapar timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 sampai ke-16; P adalah kelompok perlakuan dengan paparan timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 dan dosis asam askorbat 64 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-9 sampai ke-16



Gambar 4. Rerata kadar timbal kepala fetus antara kelompok negatif (plasebo); kelompok kontrol positif yang hanya dipapar timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 sampai ke-16 dan kelompok perlakuan dengan paparan timbal asetat dengan dosis 25 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-7 dan dosis asam askorbat 64 mg/kg BB/hari mulai gestasi hari ke-9 sampai ke-16, dianalisis dengan AAS, nilai $P < 0,05$ pada 95% confidence interval

Setelah dianalisis dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test*, data kadar timbal dalam kepala fetus ternyata berdistribusi tidak normal sehingga analisis statistik lanjutan dengan menggunakan *Kruskal Wallis test* terdapat perbedaan nyata dengan nilai F sebesar 0,000 (kurang dari nilai 0,05). Untuk mengetahui adanya perbedaan antarkelompok, maka dilanjutkan dengan *Mann-Whitney test*.

Tabel 1. Hasil analisis *Mann-Whitney test* untuk kadar timbal dalam kepala fetus

Antara kelompok	Nilai F
Plasebo & kontrol positif	0,461
Plasebo & perlakuan	0,000
Kontrol positif & perlakuan	0,000

Dari Tabel 1 menunjukkan bahwa antara kelompok plasebo dan kelompok kontrol positif memiliki nilai $F = 0,461$ (tidak terdapat perbedaan nyata) sedangkan untuk kelompok plasebo dan kelompok perlakuan, antara kelompok kontrol positif dan perlakuan memiliki nilai $F = 0,000$ (terdapat perbedaan yang nyata).

PEMBAHASAN

Timbal yang masuk dalam tubuh akan mengalami metabolisme xenobiotik di hati. Salah satu enzim yang terlibat dalam metabolisme xenobiotik adalah sitokrom P450. Keberadaan timbal juga terbukti menghambat enzim-enzim tertentu dalam sintesis haem (Murray, 2006), meningkatkan aktivitas sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) yang merupakan salah satu bentuk isoform sitokrom P450, yang berperan pada metabolisme xenobiotik (Traven *et al.*, 2008).

Asam askorbat adalah vitamin yang mudah diabsorpsi dalam lambung karena sifat keasaman lambung. Vitamin ini tidak dapat disimpan dalam tubuh, oleh karena itu bila kadar berlebih akan dikeluarkan melalui urine. Di dalam tubuh, asam askorbat dioksidasi menjadi CO_2 dan diekskresikan lewat urine berupa *L-ascorbate*, *dehydroascorbate*, *diketogulonat* dan *oxalate* (Prawirokusumo, 1991).

Aktivitas enzim CYP1A1 tertinggi dicapai oleh kelompok kontrol positif (hanya timbal saja) disusul oleh kelompok plasebo dan aktivitas enzim CYP1A1 terendah terjadi pada kelompok perlakuan dengan asam askorbat. Aktivitas enzim CYP1A1 pada kelompok plasebo memiliki aktivitas lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol perlakuan dengan askorbat, hal ini disebabkan kelompok plasebo juga mendapat paparan timbal yang berasal dari kebiasaan mencit menggigit kawat penutup kandang dan timbal yang berada dalam makanannya. Hasil analisis laboratorium menunjukkan pakan mencit, juga mengandung timbal sebesar $98 \mu\text{g}/\text{kg}$. Keberadaan timbal pada kelompok kontrol positif, meningkatkan aktivitas enzim CYP1A1, ini sesuai dengan hasil penelitian Traven *et al.* (2008) bahwa polutan sedimen laut termasuk keberadaan logam berat secara *invitro* pada sel hepar ikan, potensial menginduksi enzim CYP1A1. Preparat timbal yang diinduksikan pada hewan coba adalah timbal organik (Pb asetat) sehingga akan dimetabolisme oleh hepar. Suplementasi asam askorbat

menurunkan aktivitas enzim CYP1A1 pada hepar induk mencit yang terintoksikasi timbal, kemungkinan yang terjadi asam askorbat mengkhelat timbal sebelum masuk ke hepar induk mencit sehingga kadar timbal dalam kepala fetus dan aktivitas CYP1A1 pada kelompok perlakuan dengan asam askorbat menjadi lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok plasebo. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Berg (1984) dengan memberikan timbal dan vitamin C dalam telur ayam bertunas, menghasilkan bahwa vitamin C mampu memproteksi sistem saraf pusat dari serangan timbal. Aktivitas enzim CYP1A1 pada kelompok perlakuan dengan asam askorbat memiliki aktivitas terendah, ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2009) maupun Ueta *et al.* (2003) bahwa suplementasi vitamin C memengaruhi ekspresi gen secara tidak langsung yang menyandi CYP1A1 pada tingkatan transkripsinya. Ueta *et al.* (2003) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa vitamin C menekan asap rokok yang menginduksi ekspresi mRNA CYP1A1. *Intake* vitamin C memengaruhi ekspresi gen dari enzim antioksidan dan enzim yang mengkatalisis metabolisme xenobiotik dengan menggunakan *competitive reverse transcription-polymerase chain reaction method (competitive RT-PCR)*.

Berat molekul enzim CYP1A1 diketahui dari hasil SDS-PAGE dan keberadaan enzim CYP1A1 dalam hepar ditunjukkan dengan analisis *western blott*. Berat molekul enzim CYP1A1 memiliki kisaran nilai 53,7–54,2 kDa. Pada hasil *western blotting*, diperoleh pita yang ketebalannya hampir sama, dengan hasil *band* sangat tipis. Hal ini mungkin disebabkan oleh anti CYP1A1 yang digunakan pada penelitian ini dapat mendeteksi keberadaan protein enzim CYP1A1 dalam hepar induk mencit namun masih kurang spesifik sehingga *band* hasil elektroforesis sangat tipis. Dengan perolehan *band* yang sangat tipis, jumlah protein enzim CYP1A1 yang terdapat dalam hepar induk mencit sulit diperkirakan.

Timbal masuk ke dalam tubuh fetus melalui sirkulasi umbilical dan transfer plasenta. Plasenta pada primata dan *rhodent* dapat diinduksi untuk memproduksi protein terikat metal dengan kadar tinggi. Sebagai contoh, logam merkuri yang masuk dalam tubuh dan didapatkan sebagai sistein-metil merkuri dapat terikat dengan *transporter* asam amino untuk masuk ke otak melalui unit fetoplasental (Alfian, 2008). Pada penelitian ini didapatkan rerata kadar timbal kepala fetus untuk kelompok kontrol positif yang diberi timbal saja menempati urutan teratas dan disusul oleh kelompok plasebo dan kelompok perlakuan dengan asam askorbat. Suplementasi asam askorbat pada induk, menyebabkan timbal yang masuk dalam kepala fetus

lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok plasebo maupun kelompok kontrol positif yang diberi timbal saja. Suplementasi asam askorbat berpengaruh positif terhadap penurunan kadar timbal kepala fetus dan aktivitas enzim CYP1A1.

KEPUSTAKAAN

- Alfian Z, 2006. Merkuri: Antara Manfaat dan Efek Penggunaannya Bagi Kesehatan Manusia dan Lingkungan, *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap*, USU e-repository@2008.
- Alloway BJ, 1995. *Heavy metal in soils*. Blackie, Academic and Professional, London, 11–24.
- Ardyanto D, 2005. Deteksi Pencemaran Timah Hitam Dalam Darah Masyarakat yang Terpajan Timbal, *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 2(1): 67–76.
- Berg JM, 1984. The Effect of Ascorbic Acid on The embryotoxic and Teratogenic Effect of Lead Acetate in The Chick Embryo, *tesis*, University of British Columbia.
- Chang HJ, Park JS, Lee EK, Kim MH, Baek MK, Kim HR, Jeong HG, Choi SY, dan Jung YD, 2009. Ascorbic acid suppresses the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 expression in human HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*, Jun; 23(4): 622–6.
- Charlena, 2004. Pencemaran Logam Berat Timbal (Pb) dan Cadmium (Cd) pada Sayur-sayuran. *Falsafah Sains, disertasi*, IPB.
- Christyaningsih J, 2008. Timbal dalam hepar dan ginjal pada kasus intoksikasi timbal dengan suplementasi vitamin C, *Pelita*, Jan. 1: 23–28
- Darmono, 2001. *Lingkungan hidup dan Pencemaran*, 1st, UI Press, 11, 62–121.
- Ettinger AS, Hu, Howard, dan Hernandez M, 2006. Dietary Calcium Supplementation to Lower Blood Lead Level in Pregnancy and Lactation, *American Journal of Industrial Medicine*, 38: 361–7.
- Falcon M, Vinas P, and Luna A, 2002. Placental Lead and Outcome of Pregnancy, *Environmental Toxicology and Farmacology*, 7: 123–27.
- Kohar I, Poppy HH, Melyana J, dan Onie A, 2004. Studi Kandungan Logam Pb dalam Batang dan Daun Kangkung (*Ipomoea reptans*) yang Direbus dengan Penambahan NaCl dan Asam Asetat, *Makara Sains*, 8(3): 85–88.
- Linder MC, 1992. *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, Elsevier Science Publishing Co Inc, 167–177, 201–214.
- Murray RK, 2006. *Harper's Biochemistry*, 24th, Appleton & Lange, 637–641.
- Onunkwor B, Dosumu, Odukoya OO, Arowolo T, dan Ademuyiwa O, 2004. Biomarkers of Lead Exposure in Petrol Station Attendants and Auto-mechanics in Abeokuta, Nigeria: Effect of 2-week Ascorbic Acid Supplementation, *Environmental Toxicology and Farmacology*, 17: 169–176.
- Prawirokusumo S, 1991. *Biokimia Nutrisi*, 1st, BPFE Yogyakarta, 34–37.
- Santi DN, 2001. Pencemaran Udara oleh Timbal (Pb) serta Penanggulangannya, USU digital library.
- Shih RA, Glass TA, Bandeen-Roche K, Carlson MC, Bolla KI, Todd AC, and Schwartz BS, 2006. Environmental Lead Exposure and Cognitive Function in Community-dwelling older adult, *Neurology*, 67: 1556–1562.
- Soehendro, Sugiyanto YL, Nur M, dan Rukmini E, 2006. Kajian Pengaruh Pencemaran Udara Akibat Lalu Lintas Jalan Raya Terhadap Kandungan Timbal dalam Darah Tahun 2005, *Buletin Human Media*, 1(2): 31–39.
- Surkan PJ, Zang A, Trachtenberg F, Daniel DB, McKinlay S, dan Bellinger DC, 2007. Neuropsychological Function in Children with Blood Lead Levels < 10 µg/dL, *American Journal of Neurotoxicology Jul 25*.
- Traven L, Zaja R, Loncar J, Smital T, dan Micovic V, 2008. CYP1A Induction Potential and The Concentration of Priority Pollutans in Marine Sediment Samples-In vitro Evaluation Using the PLHC-1 Fish Hepatoma Cell Line, *Elsevier Journal: Toxicology in vitro*, Jun 24: 1–9.
- Ueta, Tadokoro Y, Yamamoto T, Yamane, C, Suzuki E, Nanba E, Otsuka Y, dan Kurata T, 2003. The Effect of Cigarette Smoke Exposure and Ascorbic Acid Intake on Gene Expression of Antioxidant Enzymes and Other Related Enzymes in the Livers and Lungs of Shionogi Rats with Osteogenic Disorder, *Toxicological Sciences*, 73: 339–347.

Reviewer: **Dr. Bambang Purnomo, drh.**