

PROSIDING

SEMINAR ILMIAH & SARASEHAN

Persatuan Biokimia & Biologi Molekuler Indonesia

“Peran Biokimia dan Biologi Molekuler
pada Era *Post Millenium Development Goals*”



Sabtu, 7 Maret 2015
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA

PROSIDING

SEMINAR ILMIAH

PERHIMPUNAN BIOKIMIA & BIOLOGI MOLEKULER INDONESIA

*“Peran Biokimia dan Biologi Molekuler pada Era *Post
Millenium Development Goals*”*

**Sabtu, 7 Maret 2015
Fakultas Kedokteran UGM**

**BAGIAN BIOKIMIA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA**

**PROSIDING
SEMINAR ILMIAH
PERHIMPUNAN BOKIMIA & BIOLOGI MOLEKULER INDONESIA
“Peran Biokimia dan Biologi Molekuler pada Era *Post Millenium
Development Goals*”**

REVIEWER:

Prof. Ir. Triwibowo Yuwono, Ph.D
Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama
dr. Ahmad Hamim Sadewa, Ph.D
Dr. Sunarti, M.Kes
Dr. Pramudji Hastuti, Apt., M.Kes
Dra. Prasetyastuti, Apt., M.Kes
dr. Arta Farmawati, Ph.D

Ukuran Buku: 15 x 21 cm

Tebal buku: 50 + v

ISBN: 978-602-70556-1-2

Penerbit:

Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran
Universitas Gadjah Mada

Alamat Penerbit:

Gd. Radiopoetro Lt 6, Sekip Utara Yogyakarta 55281

Telp. 0274 6492446 Fax. 0274-561196,

E-mail: bb.fk@ugm.ac.id

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum w.w.

Yang kami hormati para Guru Besar, Sesepeuh dan Rekan-Rekan Anggota PBBMI dari seluruh Indonesia.

Pertama, kami haturkan terima kasih atas partisipasi dan dukungan Bapak/Ibu sekalian dalam kegiatan Seminar Ilmiah dan Sarasehan yang telah terlaksana pada Sabtu 7 Maret 2015 yang lalu dengan baik dan lancar.

Pertemuan PBBMI pada kali ini mengambil topik "**Peran Biokimia dan Biologi Molekuler pada Era *Post Millenium Development Goals***" untuk memicu keinginan kita semua supaya mengevaluasi dan merencanakan kontribusi apa yang sudah dan akan kita kerjakan untuk bangsa ini. Hal ini mengingat peran aktif ilmu Biokimia dan Biologi Molekuler selalu ditunggu dan dinantikan oleh ilmu-ilmu terapan lainnya dalam bentuk penelitian-penelitian translasional. Presentasi ilmiah dan diskusi dalam kegiatan ini diharapkan dapat menghasilkan ide-ide riset, kerjasama dan jalinan *networking* diantara para peneliti.

Alhamdulillah, pada kesempatan kemarin kita telah dikumpulkan dalam sesi saresehan. Semoga pertemuan tersebut menjadi awal untuk pertemuan-pertemuan PBBMI selanjutnya. Karena sebagai organisasi keilmuan, PBBMI diharapkan menjadi wadah keilmuan atau akademik dalam bersama-mengembangkan keinginan, minat dan kompetensi anggota yang sangat heterogen.

Kami ingin menyampaikan terima kasih dan apresiasi kepada seluruh penulis yang tergabung dalam prosiding ini, pembicara seminar, peserta presentasi oral, peserta seminar, seluruh panitia yang terlibat, serta kepada para kolega yang telah berkontribusi menyukkseskan seminar ilmiah dan sarasehan ini. Kami berharap semua yang terlibat di dalamnya mendapatkan banyak manfaat.

Wassalamualaikum w.w.

dr. Ahmad Hamim Sadewa, Ph.D
Ketua Panitia

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
ISI	
1. PEMETAAN PENYAKIT ZONOTIK MENGGUNAKAN SISTEM INFORMASI GEOGRAFIS (SIG) DENGAN PENDEKATAN ONE HEALTH Wayan T. Artama, Annisa Retmanasari, Barandi S. Widartono, Mahardika A. Wijayanti¹, Sujono	1-10
2. KLONING GEN wingless-type MMTV integration site family member 4 (Wnt4) MENCIT SWISS WEBSTER UNTUK PENYEDIAAN ANTIGEN BARU DALAM IMUNOKONTRASEPSI. Agung J. Sitasiwi, Wayan T. Artama, Agung Budiyanto, Edi Dharmana PENENTUAN PATOTIPE	11-23
3. STUDI PATOTIPING VIRUS NEWCASTLE DISEASE DARI AYAM BROILER DENGAN METODE RT-PCR DAN REA Silvana Derivatif Kristoferin dan Aris Haryanto	24-29
4. PERAN ENZIM p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) TERHADAP PENINGKATAN KADAR ANGIOTENSINOGEN PADA KULTUR ADIPOSIT YANG TERPAJAN GLUKOSA Novi Khila Firani, M Rasjad Indra	30-36
5. DASAR MOLEKULER DAN MANIFESTASI KLINIS PASIEN AKONDROPLASIA DI INDONESIA Dewi Megawati, Nanis S. Marzuki, Ita M. Nainggolan, Maria Swastika, Sintia Puspitasari, Iswari Setianingsih	37-42
6. KLONING GEN PENYANDI Ag85A Mycobacterium tuberculosis Firdayanti, Ni Made Mertaniasih, Ning Rintiswati, Wayan T. Artama	43-50
7. PENGARUH HIPERGLIKEMIA TERHADAP HIGH SENSITIVE C REACTIVE PROTEIN (Hs-CRP) PADA PENDERITA DIABETES MELITUS TIPE 2 Eti Yerizel, Putra Hendra, Zulkarnain Edward, Hafni Bachtiar	51-55
8. REAKTIVITAS PANEL ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP VIRUS FLU BURUNG SUBTIPE H5N1 YANG BERSIRKULASI DI INDONESIA Ema Qurnianingsih, Kadek Rachmawati, Reviany V. Nidom, Rahmalia D. Suindari, Suhartati, Chairul A. Nidom	56-62
9. EFEK EKSTRAK DAUN TORBANGUN (<i>Coleus amboinicus</i> Lour) SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA HATI TIKUS DIABETES Trini Suryowati, Rimbawan, Rizal Damanik, Maria Bintang, Ekowati Handharyani	63-68
10. POLA MUTASI VIRUS FLU BURUNG H5N1 PADA BERBAGAI INANG BERDASARKAN KAJIAN MOLEKULER FRAGMENT HEMAGGLUTININ Kadek Rachmawati, Ema Qurnianingsih, Muhamad Y. Alamudi, Setyarina Indrasari, Soetjipto, Chairul A. Nidom	69-81
11. IN SILICO DOCKING MOLEKULER ANTITUBERKULOSIS TERHADAP TARGET ENZIM ALANIN RACEMASE DAN TIMIDILAT SINTASE MYCOBACTERIUM TUBERKULOSIS H37Rv St Khaerunnisa, Suhartati, Ira Humairah, Reza Arta Bagaskoro Nugroho	82-91

12. KLONING GEN PENYANDI Ag85B <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Sri Aprilianti Idris, Wayan T Artama, Ning Rintiswati	92-99
13. PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KAKAO (<i>Theobroma cacao L.</i>) TERHADAP PROFIL LIPID dan KADAR NO _x TIKUS PUTIH JANTAN (<i>Rattus norvegicus</i>) DISLIPIDEMIA Dewi Wiryanthini IA, Sutadarma IWG, Yuliana	100-105
14. EFEK KUERSETIN TERHADAP EKSPRESI GEN ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (eNos) DI SEL OTOT JANTUNG DAN SEL ENDOTHELIAL AORTA TIKUS DIABETES MELITUS TIPE 2 Tien, Ahmad Hamim Sadewa, Arta Farmawati	106-115
15. GENOTIPE VIRUS HEPATITIS B (VHB) PADA PENDERITA HEMODIALISIS (HD) DENGAN HBSAG NEGATIF DI RSUD DR. SOETOMO, SURABAYA, INDONESIA Retno Handajani, Lina Lukitasari, Mochamad Amin, Mochammad Thaha, Soetjipto	116-124
16. ANALISIS POLIMORFISME -2578*C/A GENA VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A (VEGF-A) DENGAN TEKNIK ARMS-PCR PADA INDIVIDU DENGAN DAN TANPA ULKUS DIABETIKA Ika Rahayu, Hemi Sinorita, Kris Herawan Timotius, Ahmad Hamim Sadewa	125-130
17. PENGARUH EKSPRESI LIPOPROTEIN LIPASE TERHADAP KADAR TRIGLISERIDA SERUM PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 YANG TERPAPAR KUERSETIN JANGKA PENDEK Sylvia Rianissa Putri, Arta Farmawati, Tasmini	131-139
18. EFEK EKSTRAK KULIT MANGGIS PADA MDA DARAH TIKUS WISTAR TERPAPAR FLUPHENAZIN DEKANOAT Innawati Jusup, Irena Aryani Puspwardojo	140-144
19. VIRUS NEWCASTLE DISEASE PADA AYAM KAMPUNG DENGAN METODE RT-PCR DAN REA. Wahyu Haryanto dan Aris Haryanto	145-154
20. PEMANFAATAN PROBIOTIK BAKTERI ASAM LAKTAT <i>Streptococcus thermophilus</i> DARI LIMBAH KOTORAN IKAN TERHADAP PERFORMAN PERTUMBUHAN DAN KADAR KOLESTEROL DAGING AYAM BROILER Strain <i>Lohmann</i> Astuti, Zaenal Bachruddin, Supadmo, Eni Harmayani	155-165
21. PENENTUAN PROTEIN EFFICIENCY RATIO (PER) TEPUNG KORO PEDANG PUTIH (<i>Canavalia ensiformis L.</i>) PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY JANTAN LEPAS SAPIH Agnes-Murdiati, Citra Bonita Permatasari, dan Sri Anggrahini	166-175

PEMETAAN PENYAKIT ZONOTIK MENGGUNAKAN SISTEM INFORMASI GEOGRAFIS (SIG) DENGAN PENDEKATAN *ONE HEALTH*

Wayan T. Artama^{1,4}, Annisa Retmanasari¹, Barandi S. Widartono²,
Mahardika A. Wijayanti^{1,5}, Sujono³

¹Program Studi Pascasarjana Ilmu Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada; ²Departemen GISRP, Fakultas Geografi, Universitas Gadjah Mada; ³Politeknik Kesehatan Kemenkes, Yogyakarta; ⁴*Ecohealth Resource Center*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, ⁵Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

E-mail: artama@ugm.ac.id

ABSTRAK

Toksoplasmosis adalah suatu penyakit kosmopolitan akibat infeksi oleh *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting karena memiliki dampak sosial-ekonomi yang berkaitan dengan biaya perawatan penderita, retardasi mental, hidrosefalus, keguguran pada ibu hamil dan kerugian ekonomi pada peternak akibat keguguran pada hewan ternak. Toksoplasmosis juga penyakit yang mematikan pada penderita immunosupresif seperti AIDS. *Toxoplasma gondii* dapat ditemukan pada manusia, hewan mamalia dan unggas sebagai hospes antara. Kucing merupakan hospes definitif dari protozoa ini. Manusia terinfeksi akibat menelan ookista dari tinja kucing yang mencemari sayuran mentah, buah dan air, mengkonsumsi daging ternak yang mengandung kista dan dimasak tidak cukup matang, transmisi dari ibu ke janin melalui plasenta, transfusi darah dan pencangkokan organ.

Faktor risiko yang diteliti yaitu jenis kelamin, usia, interaksi dengan kucing, keberadaan kucing, konsumsi daging setengah matang, konsumsi sayuran mentah, pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air, pekerjaan/aktivitas kontak dengan tanah, kondisi geografis (elevasi, suhu, jarak dengan sungai).

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium dan survei, yaitu usaha pengumpulan informasi dari sebagian populasi yang dianggap dapat mewakili populasi tersebut melalui pendekatan *One Health*. Metode untuk mendeteksi Toksoplasmosis menggunakan ELISA dengan protein rekombinan GRA-1 takizoit *T. gondii* isolat lokal sebagai antigen. Lokasi di DIY dan Jawa Tengah bagian selatan memiliki jumlah masing-masing sampel sebanyak 1050 (di Kota Yogyakarta, Kabupaten Sleman, Bantul, Gunungkidul dan Kulonprogo) dan 630 (Kabupaten Purworejo, Kebumen, Cilacap, Banyumas, Purbalingga, Banjarnegara dan Wonosobo) yang dikumpulkan dengan menerapkan rancangan klaster dua tahap. Analisis statistik yang digunakan yaitu *chi square* (bivariat) dan *overlay* pada pemetaan.

Hasil yang didapat dari penelitian ini bahwa seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi DIY adalah 61,5%. Faktor risiko toksoplasmosis di Provinsi DIY yaitu jenis kelamin, kontak dengan kucing, elevasi, sayuran mentah di warung lesehan, pekerjaan kontak dengan daging mentah, dan pekerjaan/aktivitas kontak dengan tanah.

Seroprevalensi toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan yaitu 62,54%. Distribusi keruangan toksoplasmosis Jawa Tengah bagian selatan dengan menggunakan SIG terlihat pengelompokan kasus di setiap wilayah yang terinfeksi toksoplasmosis dan terjadi pula pada wilayah yang tidak ada kasus toksoplasmosis. Faktor risiko terjadinya kasus toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan yaitu keberadaan kucing, pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air, dan elevasi.

Kata kunci: Toksoplasmosis, seroprevalensi, Sistem Informasi Geografis, protein rekombinan

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis adalah suatu penyakit kosmopolitan akibat infeksi oleh *Toxoplasma gondii*, suatu parasit obligat intraselular yang dapat membentuk kista pada jaringan di seluruh badan mamalia.¹ Toksoplasmosis merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting, karena dampak ekonomi-sosial yang tinggi berkaitan dengan biaya perawatan penderita.² Penyakit ini dapat mengakibatkan penyakit akut sampai kronis. Ibu yang terinfeksi *Toxoplasma* saat hamil akan menurunkan penyakit tersebut ke janinnya dan berdampak pada ketidaknormalan bayi seperti *hidrocephalus*, dan retardasi mental.³ Orang yang memiliki kondisi immunosupresi seperti AIDS akan menunjukkan efek yang lebih fatal.

Toxoplasma gondii menginfeksi sel berinti seperti sel sperma, sel telur, sel darah putih dan sel saraf. *Toxoplasma gondii* memiliki siklus hidup di inang definitif (bangsa kucing) dan inang perantara (mamalia, unggas). Siklus reproduktif dari *Toxoplasma* ini hanya terdapat di inang definitif. Terdapat 2 bentuk dalam siklus *Toxoplasma* yaitu takizoit (fase akut) dan bradizoit/kista jaringan (fase kronis). *Toxoplasma* memiliki protein yang berguna ketika parasit ini menginvasi sel salah satunya protein GRA. Protein GRA-1 jumlahnya lebih banyak dibandingkan protein GRA yang lain. Protein GRA tereksositis selama invasi dan setelah invasi ke dalam vakuola parasitoporus. Protein ini dapat digunakan sebagai deteksi keberadaan dari takizoit di dalam darah inang.⁴ Respon imun yang berperan selama parasit ini menginfeksi antara lain imunitas humoral dan imunitas seluler. Respon imun humoral berkaitan dengan bentuk takizoit ekstraseluler yang aktif dan invasif dalam sistem sirkulasi. Respon imun ini juga terjadi pada permukaan mukosa seperti pada saluran

usus. Antibodi pada sistem sirkulasi (sistemik) yang berperan utama adalah IgM dan IgG, sedangkan pada permukaan mukosa yang lebih dominan berperan yaitu sIgA.

Provinsi DIY terbagi menjadi empat kabupaten dan satu kota yaitu Kabupaten Kulonprogo, Kabupaten Bantul, Kabupaten Gunungkidul, Kabupaten Sleman dan Kota Yogyakarta. Sebagian besar terletak pada ketinggian antara 100-499 mdpl, suhu udara rata-rata di Yogyakarta tahun 2007 menunjukkan angka 27,35°C. Kelembaban udara tercatat antara 69-96%. Kondisi geografis dan iklim ini merupakan kondisi lingkungan yang bagus untuk perkembangan ookista menjadi bentuk infeksi.⁵ Prevalensi toksoplasmosis pada kambing dan sapi di Yogyakarta adalah 78% dan 21%.⁶ Daging kambing ini biasanya dikonsumsi dalam bentuk sate yang banyak diperdagangkan di pedesaan maupun perkotaan, dan kemungkinan pada daging tersebut masih terdapat kista dan tidak semua kista mati pada proses pengolahan sate. Penanganan daging kambing dan daging ternak mentah juga berpotensi menyebabkan infeksi toksoplasmosis pada tukang jagal, pedagang dan juru masak melalui perlakuan atau kebersihan yang kurang. Studi seroepidemiologi toksoplasmosis pada pekerja RPH dan penjual daging kambing di Surabaya menunjukkan toksoplasmosis yang tinggi.⁶

Toxoplasma gondii memerlukan manusia, hewan dan lingkungan sebagai faktor pendukung kelangsungan hidupnya. Ookista yang dikeluarkan dari feses kucing yang terinfeksi dan telah bersporulasi mampu hidup sampai bertahun-tahun di lingkungan karena dipengaruhi oleh kelembaban dan paparan sinar matahari (suhu) di area tersebut. Kasus toksoplasmosis diketahui lebih besar di dataran yang lebih rendah daripada dataran yang lebih tinggi. Sumber air terkontaminasi dengan ookista dari tanah pada saat terjadi banjir atau tanah yang hanyut saat hujan.

Tanah yang hanyut ini juga membawa ookista dari tempat yang lebih tinggi ke tempat yang lebih rendah. Ookista yang telah mengkontaminasi sungai mengalir ke tempat yang lebih rendah.⁷ Mekanisme tersebut akan berdampak pada penyebaran toksoplasmosis di beberapa daerah yang memiliki kondisi geografis yang mendukung.

Jawa Tengah merupakan salah satu provinsi yang pernah diteliti terjadi kasus toksoplasmosis pada tahun 1975 yaitu sebanyak 20%. Jawa Tengah bagian selatan memiliki karakter lokasi pegunungan dengan daerah landai di bagian selatan. Wilayah ini memiliki banyak daerah aliran sungai (DAS) besar yang mengalir ke berbagai kabupaten di provinsi tersebut. Perbedaan suhu dan kelembaban udara karena perbedaan ketinggian lokasi, banyak peternakan hewan, daerah persawahan dan perkebunan yang diirigasi dari bendungan yang masuk dalam daerah aliran sungai memungkinkan sebagai faktor distribusi dari toksoplasmosis.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui seroprevalensi toksoplasmosis dan faktor-faktor risiko di Provinsi DIY dan Jawa Tengah bagian selatan dengan pendekatan One Health, serta mengetahui distribusi keruangan toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan. Sehingga diharapkan dapat memberikan informasi tentang toksoplasmosis di DIY dan Jawa Tengah bagian selatan dengan pendekatan One Health, tentang distribusi keruangan toksoplasmosis dan populasi yang berisiko terhadap toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan dengan menggunakan SIG, serta dapat digunakan untuk pedoman bagi Dinas Kesehatan dalam membuat kebijakan yang berkaitan dengan penanganan toksoplasmosis di DIY dan Jawa Tengah bagian selatan.

METODE

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan *cross-sectional*. Menurut Iwan (1996), penelitian survei dapat menggunakan metode survei cepat (*Rapid Surveys*), yaitu metode yang pertama kali dikembangkan pada proyek *Expanded Programme on Immunization* (EPI) dari WHO. Metode ini menerapkan rancangan sampel kluster 2 tahap, dengan pemilihan kluster pada tahap pertama secara *probability proportionate to size* (PPS). Pemilihan tahap kedua yaitu pemilihan sampel rumah tangga, dilakukan dengan cara acak sederhana (*simple random*) atau dengan menerapkan sistem rumah terdekat. Pedoman WHO untuk masalah kesehatan yang kejadiannya sering memiliki persentase 15-85%. Jadi jumlah sampel minimal yang diambil yaitu 196 untuk masing-masing kluster. Sepuluh persen dari minimal sampel diambil sebagai cadangan apabila terjadi kesalahan menjadi kurang lebih 210 orang.

Serum yang didapatkan ditampung pada tabung appendorf 1,5ml dan disimpan pada -20°C. Kontrol positif dari penderita toksoplasmosis didapatkan dari Rumah Sakit Sardjito. Serum responden di uji menggunakan ELISA dengan protein rekombinan GRA 1 sebagai antigen. Data sekunder untuk faktor risiko diperoleh berdasarkan satu kali survei dengan menggunakan perangkat kuesioner terhadap sampel yang dipilih. Analisis statistik yang digunakan yaitu *chi square* (bivariat) dan *overlay* pada pemetaan.

HASIL

Seroprevalensi toksoplasmosis berdasarkan IgM atau IgG antitoksoplasma positif di Provinsi DIY adalah 61,5%. Seroprevalensi tertinggi di Kabupaten Kulonprogo (78,6%), kemudian di Kabupaten Sleman (72,4%), Kota Yogyakarta (69,5%),

Kabupaten Bantul (57,6%) dan terendah di Kabupaten Gunungkidul sebesar 29,5%.

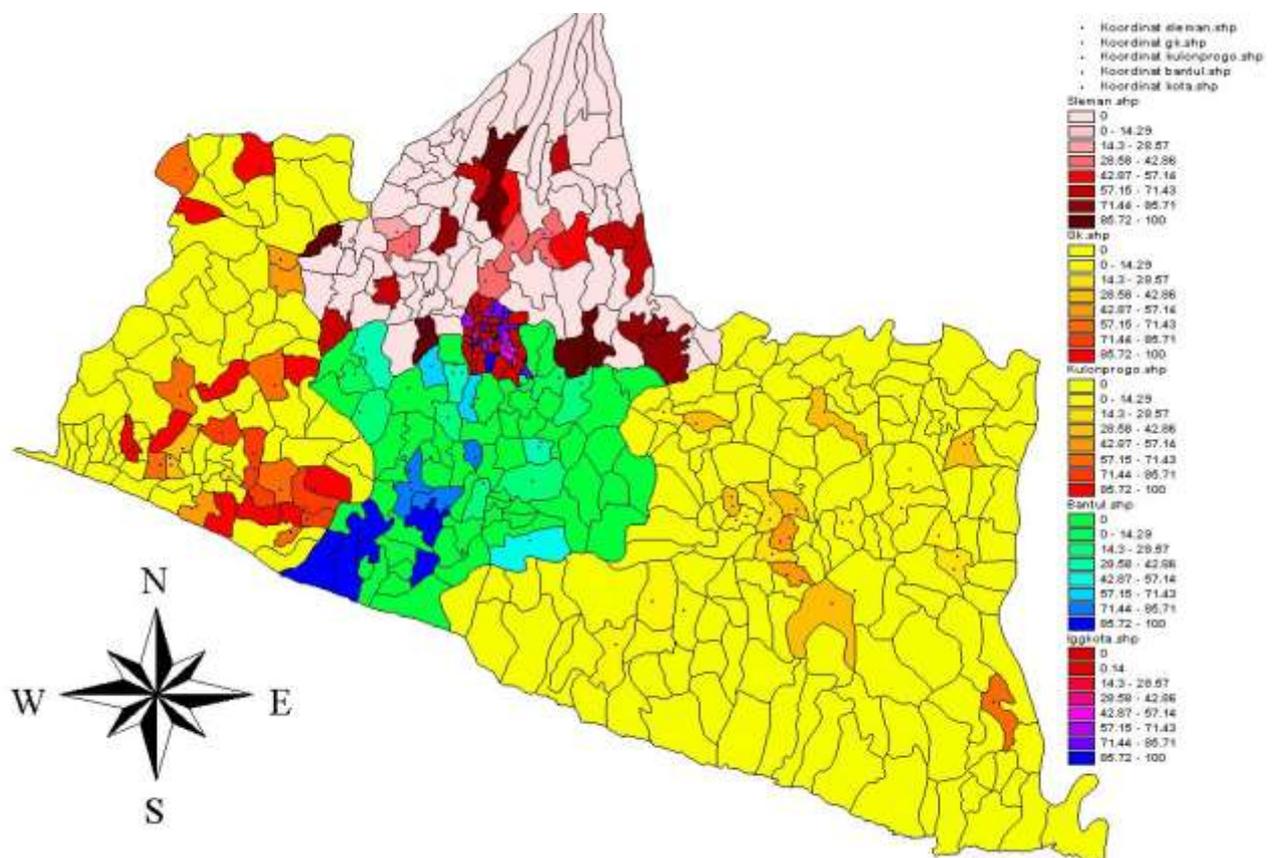
Analisis bivariat dengan *Chi Square* untuk menguji hubungan antara

karakteristik/faktor risiko dengan seroprevalensi toksoplasmosis dan besarnya *Odds Ratio* (OR) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji hubungan antara karakteristik/faktor risiko dengan seroprevalensi toksoplasmosis dengan *Chi Square Test* di Provinsi DIY

Karakteristik	OR (CI 95%)	<i>p value</i>
Jenis Kelamin	1,415 (1,097-1,825)**	0,007*
Usia	-	0,845
Interaksi dengan Kucing	1,346 (1,040-1,741)**	0,024*
Konsumsi Daging Setengah Matang	4,675 (3,574-6,116)**	0,000*
Konsumsi Sayuran Mentah	9,042 (6,720-12,168)**	0,000*
Pekerjaan/Aktivitas Kontak dengan Daging Mentah	1,883 (1,325-2,624)**	0,000*
Sumber air	1,701 (1,232-2,349)**	0,001*
Pekerjaan/aktivitas kontak dengan tanah	5,481 (4,163-7,217)**	0,000*
Elevasi	-	0,000*

Keterangan: **p value* ≤ 0,05 signifikan; ** OR>1 dan batas bawah CI lebih dari 1 sebagai faktor risiko



Gambar 1. Peta seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta.

Karakteristik dan faktor risiko yang mempunyai hubungan bermakna ($p < 0,05$) dengan seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi adalah jenis kelamin, geografis (elevasi), interaksi dengan kucing, konsumsi sate kambing, konsumsi sayuran mentah, pekerjaan kontak dengan daging mentah, sumber air, dan pekerjaan/aktivitas kontak dengan tanah. Gambar 1 menunjukkan bahwa distribusi toksoplasmosis di daerah Gunung Kidul paling sedikit dibandingkan kabupaten lainnya.

Hasil Pemeriksaan IgG dan IgM antitoksoplasma menunjukkan bahwa prevalensi toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan yaitu 62,54% ($>40\%$). Faktor risiko yang berpengaruh terhadap kejadian toksoplasmosis yaitu keberadaan kucing, kepemilikan hewan ternak/peliharaan, sumber air, pekerjaan atau aktivitas kontak dengan daging mentah dan elevasi, seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil hubungan faktor-faktor risiko terhadap kasus toksoplasmosis dengan analisis bivariat di Jawa Tengah bagian selatan.

Karakteristik	OR (CI 95%)	<i>p value</i>
Jenis Kelamin	0,901 (0,649-1,260)	0,610
Usia	0,449 (0,231-0,871)	0,023*
Interaksi dengan Kucing	0,724 (0,506-1,035)	0,092
Keberadaan Kucing	1,423 (1,022-1,981)**	0,045*
Konsumsi Daging Setengah Matang	0,707 (0,511-0,977)	0,044*
Konsumsi Sayuran Mentah	0,412 (0,087-1,959)	0,412
Pekerjaan/Aktivitas Kontak dengan Daging Mentah	1,772 (1,274-2,465)**	0,001*
Sumber Air	1,740 (1,218-2,485)**	0,003
Pekerjaan/Aktivitas kontak dengan Tanah	0,580 (0,301-1,117)	0,136
Elevasi	56,198 (27,648-114,229)**	0,000*
Suhu	0,320 (0,200-0,507)	0,000*
Jarak dengan Sungai	0,275 (0,135-0,563)	0,000*

Keterangan: **p value* $\leq 0,05$ signifikan; ** OR >1 dan batas bawah CI lebih dari 1 sebagai faktor risiko.

Karakteristik yang berpotensi sebagai faktor risiko terhadap kasus toksoplasmosis ketika memiliki nilai *p value* $\leq 0,05$ signifikan; OR >1 dan batas bawah CI lebih dari 1. Faktor risiko tersebut antara lain elevasi, pekerjaan atau aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air, dan keberadaan kucing. Elevasi memiliki peran paling besar dengan nilai OR 56,198 dan 95% CI (27,648-114,229), yang berarti bahwa lokasi yang berada di ketinggian ≤ 200 mdpl atau disekitar hilir sungai memiliki risiko 56,198 kali terhadap toksoplasmosis

dibandingkan yang berada di ketinggian >200 mdpl atau sekitar hulu sungai.

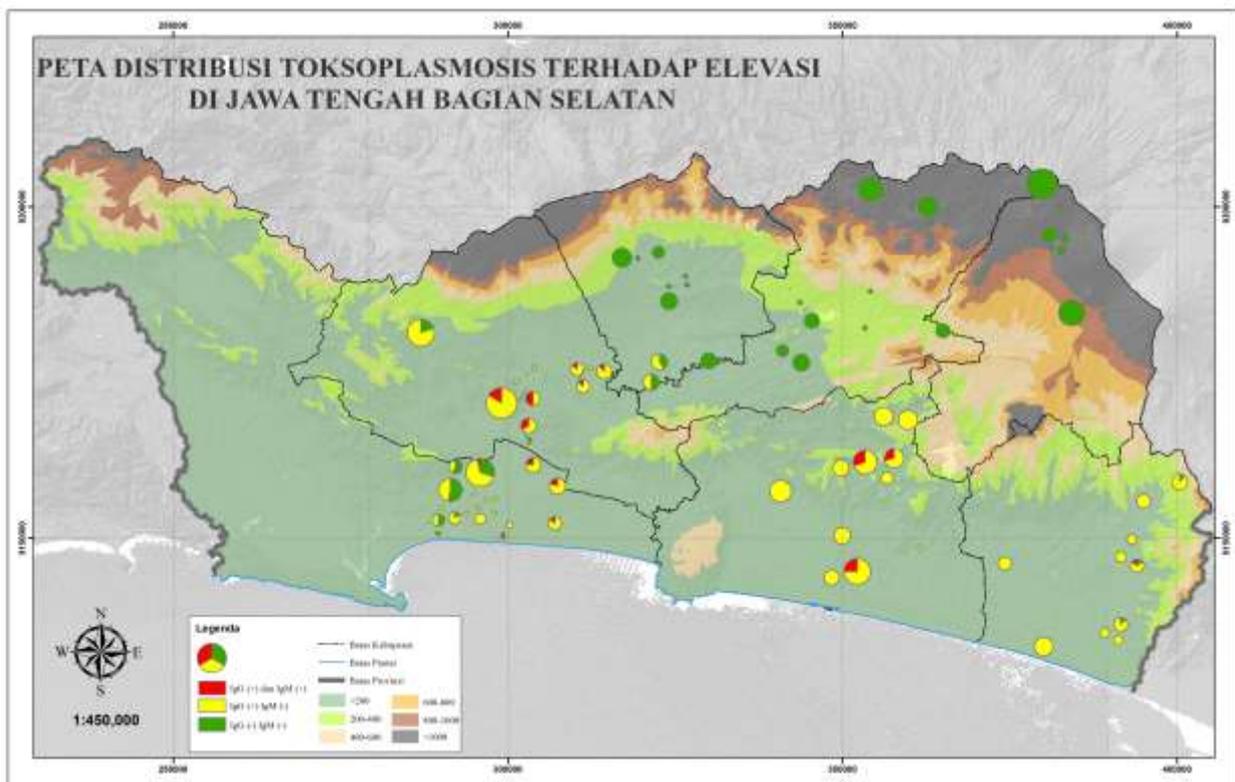
Pekerjaan atau aktivitas kontak langsung dengan daging mentah memiliki nilai 95% CI (1,274-2,465) dan OR 1,772 yang berarti bahwa responden dengan aktivitas ini berisiko 1,772 kali terinfeksi *T. gondii* dibandingkan dengan yang tidak.

Sumber air dengan nilai 95% CI (0,200-0,507) menunjukkan bahwa sumber air berhubungan terhadap kejadian toksoplasmosis. Sumber air yang tidak difiltrasi memiliki risiko terhadap toksoplasmosis sebanyak 1,740 kali dibandingkan dengan

yang telah difiltrasi. Keberadaan kucing sebagai faktor risiko paling rendah di wilayah ini dengan nilai OR 1,423 dan CI (1,002-1,981), yang berarti bahwa lokasi yang memiliki lingkungan dengan jumlah kucing lebih banyak beresiko 1,423 kali terkena toksoplasmosis dibandingkan lokasi dengan jumlah kucing sedikit.

Distribusi dari kasus toksoplasmosis di setiap kabupaten Jawa Tengah bagian selatan dapat dilihat pada Gambar 2. Beberapa simbol dipeta menggambarkan kondisi geografis dan

distribusi dari toksoplasmosis di Jawa tengah bagian selatan. Kategori dari kasus toksoplasmosis diberi warna sesuai dengan tingkat infeksi. Warna coklat tua pada peta menunjukkan lokasi dataran tinggi (daerah pegunungan), kemudian diikuti dengan warna kuning dan hijau (perbukitan) yang menunjukkan lokasi lebih rendah dari pada warna sebelumnya secara berurutan. Warna biru tua menunjukkan lokasi dataran paling rendah dibandingkan warna sebelumnya, hijau.



Gambar 2. Distribusi toksoplasmosis terhadap elevasi di Jawa Tengah bagian selatan.

Distribusi toksoplasmosis di Kabupaten Purworejo, Kebumen dan Banyumas di dominasi dengan lingkaran berwarna kuning (IgG (+) dan IgM (-)) dan merah (IgG (+) dan IgM (+)). Lokasi pengambilan sampel di ketiga kabupaten tersebut berada di daerah dataran rendah dan pegunungan. Lingkaran warna kuning menunjukkan kasus toksoplasmosis yang sudah lama terjadi di wilayah tersebut dan warna merah menunjukkan terjadinya

reinfeksi toksoplasmosis. Kabupaten Cilacap dan Purbalingga di dominasi oleh warna kuning dan hijau (IgG (-) dan IgM (-)). Kabupaten Cilacap yang dijadikan sebagai lokasi pengambilan sampel berada di daerah dataran rendah, sedangkan Kabupaten Purbalingga berada di daerah vulkanik endapan kuarterer atau daerah perbukitan. Kabupaten Banjarnegara, dan Wonosobo didominasi hanya lingkaran berwarna hijau (IgG dan IgM negatif) yang berada di lokasi

pegunungan atau perbukitan. Lingkaran warna hijau pada pengeplotan lokasi penelitian menunjukkan tidak adanya kasus toksoplasmosis di wilayah tersebut.

PEMBAHASAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii*. Dampak yang terjadi apabila terinfeksi penyakit ini dapat menimbulkan penyakit akut sampai kronis. Takizoit yang merupakan salah satu stadium aktif dari *T. gondii* pada tubuh inang merupakan fase akut, sedangkan ketika sudah menjadi bradizoit (kista jaringan) termasuk fase kronis. Perbedaan dari stadium yang terjadi pada tubuh inang perantara dipengaruhi dari sistem imun masing-masing dari inang perantara tersebut ketika terinfeksi parasit ini.⁸

Infeksi *Toxoplasma gondii* ke sel inang perantara dapat secara vertikal maupun horizontal. Pada wanita hamil yang memiliki sistem imun normal, infeksi dari *T. gondii* dapat menyebabkan *hidrocephalus* dan penyakit neurologi pada janin, tergantung dari waktu terjadinya infeksi.⁹ Anak yang lahir nantinya hanya membawa immunoglobulin G (IgG) terhadap toksoplasmosis yang berasal dari ibunya. Antibodi jenis ini dapat menembus plasenta masuk ke janin dan berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9 bulan.¹⁰ Penyakit toksoplasmosis ini akan semakin fatal ketika sistem imun dari inang perantara mengalami immunosupresi. Toksoplasmosis dapat menyebabkan *toxoplasmic encephalitis* terutama pada penderita AIDS.⁸

Faktor risiko yang mempunyai hubungan bermakna ($p < 0,05$) dengan seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi DIY adalah jenis kelamin, geografis (elevasi), interaksi dengan kucing, konsumsi daging setengah matang, konsumsi sayuran mentah, pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air, dan

pekerjaan/aktivitas yang ada kontak dengan tanah, sedangkan di Jawa Tengah bagian selatan yaitu keberadaan kucing, pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air, dan elevasi.

Toksoplasmosis dapat menyerang siapa saja disegala umur.¹¹ Penyakit ini pada wanita dan usia produktif terlihat lebih fatal dibandingkan laki-laki atau di usia lainnya. Wanita pada usia tersebut masih dalam rentan waktu produktif untuk hamil dan menghasilkan keturunan. Jenis kelamin di Provinsi DIY dan usia di Jawa Tengah bagian selatan berhubungan dengan kejadian toksoplasmosis. Pernyataan ini sesuai dengan teori yang telah diungkapkan sebelumnya bahwa toksoplasmosis dapat menyerang siapa saja.

Interaksi dengan kucing terbukti mempunyai hubungan dengan seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi DIY, kecuali di Kabupaten Gunungkidul. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang terjadi di Iran, dimana interaksi dengan kucing memiliki hubungan yang bermakna dengan prevalensi toksoplasmosis.¹² Keberadaan kucing sebagai hospes definitif dengan kondisi suhu, kadar oksigen serta kelembaban tanah yang tinggi merupakan faktor yang mendukung perkembangan ookista menjadi infeksius.⁵ Keberadaan kucing yang terinfeksi memungkinkan terjadinya pencemaran ookista di tanah. Terbukti dengan pekerjaan atau kegiatan yang ada kontak langsung dengan tanah mempunyai hubungan yang bermakna dengan seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi DIY, kecuali di Kabupaten Gunungkidul. Kabupaten ini memiliki kelembaban rendah (tanah kering) dan batu kapur, sehingga ookista tidak bertahan lama di kondisi tanah tersebut. Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa interaksi antara manusia dengan kucing tidak signifikan terhadap kejadian toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan. Kucing yang terinfeksi

toksoplasmosis kemungkinan hanya sebatas menyebarkan ookista, sehingga penularan ke manusia dapat terjadi melalui faktor risiko yang lain. Interaksi langsung dengan kucing bukan merupakan faktor risiko dari kasus toksoplasmosis di wilayah ini.

Keberadaan kucing di Jawa Tengah bagian selatan secara umum relatif sedikit. Setiap Kabupaten memiliki variasi dalam keberadaan kucing dilingkungannya. Jumlah yang banyak atau sedikit belum tentu mengindikasikan bahwa kucing di lokasi tersebut bukan sebagai faktor risiko toksoplasmosis. Peluruhan feses kucing yang terinfeksi toksoplasmosis hanya terjadi satu kali seumur hidup dari kucing.¹³ Ookista yang dikeluarkan dalam satu kali peluruhan tersebut dapat mencapai ribuan.¹⁴ Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara keberadaan kucing terhadap kasus toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian Selatan. Lokasi yang memiliki kucing banyak beresiko 1,423 kali dibandingkan dengan lokasi yang memiliki jumlah kucing sedikit. Lokasi di Jawa Tengah bagian selatan yang memiliki risiko terkena toksoplasmosis dari faktor keberadaan kucing yaitu Kabupaten Purworejo dan Kebumen. Jumlah kucing di kedua lokasi tersebut cukup banyak dibandingkan kelima kabupaten lainnya di Jawa Tengah bagian selatan. Kabupaten Banjarnegara dan Wonosobo tidak terdapat kasus toksoplasmosis. Lokasi dengan daerah perbukitan dan lereng yang curam di beberapa lokasi akan berpengaruh terhadap keberadaan kucing di lokasi tersebut juga. Keberadaan kucing positif toksoplasmosis yang relatif sedikit akan meminimalisir persebaran dari ookista.

Pencemaran ookista pada tanah ini juga menyebabkan tingginya prevalensi toksoplasmosis pada kambing di Yogyakarta yaitu sebesar 78%.¹⁵ Tingginya prevalensi toksoplasmosis pada kambing ini menyebabkan pola makan dan makanan yaitu

konsumsi daging kambing yang dimasak tidak cukup matang, mempunyai hubungan yang bermakna dengan seroprevalensi toksoplasmosis di Provinsi DIY dengan *odds ratio* sebesar 4,087. Daging yang dimasak setengah matang memungkinkan kita yang terdapat dalam daging tersebut belum mati. Kita hanya dapat mati apabila dipanaskan pada suhu 67°C selama 5 menit.¹⁵

Faktor risiko yang mempunyai *odds ratio* terbesar di Provinsi DIY adalah konsumsi sayuran mentah. Proses pencucian sayuran biasanya dilakukan pada air dalam wadah. Sayuran yang tercemar ookista dari tanah, dapat menyebabkan toksoplasmosis apabila pencucian sayuran yang dikonsumsi mentah ini kurang baik.

Orang dengan pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah tertular karena darah dari hewan yang terinfeksi dapat masuk melewati luka dari pekerja tersebut. Studi seroepidemiologi toksoplasmosis pada pekerja RPH dan penjual daging kambing di Surabaya menunjukkan toksoplasmosis yang tinggi, yaitu pada pemotong kambing di RPH sebesar 85% dan 55%, pada pemotong kambing di luar RPH sebesar 80% dan 40%, serta pada penjual daging kambing 80% dan 30%.⁶ Responden di Jawa Tengah bagian selatan yang memiliki pekerjaan/aktivitas kontak langsung dengan daging mentah dengan jumlah banyak terdapat di Kabupaten Purworejo, Kebumen, Banyumas, Purbalingga dan Wonosobo. Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa responden yang memiliki aktivitas atau pekerjaan kontak langsung dengan daging mentah memiliki risiko 1,772 kali dibandingkan yang tidak. Aktivitas atau pekerjaan kontak langsung dengan daging mentah sebagai faktor risiko toksoplasmosis di Kabupaten Purworejo, Kebumen, Banyumas, dan Purbalingga. Responden yang terinfeksi toksoplasmosis akibat dari aktivitas atau pekerjaan kontak langsung dengan daging mentah dapat terjadi karena mereka tidak

menggunakan perlindungan seperti sarung tangan atau plastik. Lebih dari 80% responden tidak perlindungan saat kontak dengan daging mentah.

Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa sumber air di Provinsi DIY dan Jawa Tengah bagian selatan signifikan terhadap kasus toksoplasmosis. Responden yang menggunakan sumber air yang tidak difiltrasi kemungkinan risiko terkena kasus toksoplasmosis lebih besar dibandingkan dengan responden yang menggunakan sumber air difiltrasi. Sumber air yang tidak difiltrasi dapat berasal dari sungai, sumur dan waduk. Air tidak sebatas digunakan untuk konsumsi saja, tapi juga untuk mencuci sayuran, dan diberikan ke hewan ternak mereka. Sumber air di Kabupaten Cilacap paling banyak menggunakan air yang difiltrasi. Penggunaan air yang difiltrasi tersebut menyebabkan tidak ditemukannya kasus toksoplasmosis di beberapa lokasi di Kabupaten Cilacap. Proses filtrasi salah satunya menggunakan klorin. Ookista tidak dapat hidup lama di air dengan kondisi dingin atau dengan air hangat, klorinasi, treatment ozon.¹³

Elevasi mempunyai hubungan yang bermakna dengan seroprevalensi toksoplasmosis. Orang yang tinggal di dataran dengan ketinggian <100m diatas permukaan laut (di Kabupaten Bantul) mempunyai risiko terinfeksi toksoplasmosis sebesar 1,356 kali dibanding orang yang tinggal di dataran dengan ketinggian >100 m (Kabupaten Gunungkidul). Lokasi di Jawa Tengah bagian selatan terutama di Kabupaten Wonosobo dan Banjarnegara pada penelitian ini tidak terdapat kasus toksoplasmosis. Ketinggian lokasi kedua kabupaten tersebut lebih dari 400 mdpl. Daerah pegunungan dan beberapa lokasi dengan kemiringan yang curam menyebabkan ookista tidak akan bertahan lama di lokasi tersebut dan terbawa ke daerah yang lebih rendah. Lokasi di dataran tinggi berpengaruh pula pada keberadaan kucing. Jumlah kucing

sebagai faktor definitif yang sedikit di dataran tinggi akan meminimalisir kasus toksoplasmosis di wilayah tersebut. Tanah yang hanyut saat hujan akan membawa ookista dari tempat yang lebih tinggi ke tempat yang lebih rendah. Ookista yang telah mengkontaminasi sungai mengalir ke tempat yang lebih rendah. Mekanisme-mekanisme tersebut menyebabkan prevalensi di tempat yang rendah akan lebih tinggi.⁷

SIMPULAN

1. Seroprevalensi toksoplasmosis berdasarkan IgM atau IgG antitoksoplasma positif yang diperiksa dengan metode ELISA menggunakan protein rekombinan GRA-1 takizoit *T. gondii* isolat lokal di Provinsi DIY dan di Jawa Tengah bagian selatan tinggi (>40%) yaitu 61,5% dan 62,54%.
2. Distribusi keruangan toksoplasmosis Jawa Tengah bagian selatan dengan menggunakan SIG terlihat pengelompokan kasus di setiap wilayah yang terinfeksi toksoplasmosis dan terjadi pula pada wilayah yang tidak ada kasus toksoplasmosis. Distribusi toksoplasmosis paling banyak di dataran rendah.
3. Faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian toksoplasmosis di DIY yaitu jenis kelamin, interaksi dengan kucing, elevasi, konsumsi sayuran mentah, pekerjaan/aktivitas kontak dengan daging mentah, sumber air dan pekerjaan/aktivitas kontak dengan tanah, sedangkan faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian toksoplasmosis di Jawa Tengah bagian selatan yaitu keberadaan kucing, pekerjaan/aktivitas kontak langsung dengan daging mentah, sumber air, dan elevasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemediknas yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Unggulan UGM 2014-2015.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hill, D.E., Sreekumar, C., Jones, J., and Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii*. Dalam: *Foodborne Disease*. Simjee, S. and Poole, T.L. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 2007.
2. Roberts T, Murrell KD, and Marks S. Economic losses caused by foodborne parasitic disease. *Parasitol Today*. 1994; 10:419-423.
3. Panah, A. S., Assadi, M., Soufiani, K. B., Barzegar, G., Gharachrlou, A., Zeydi, A. E. Seroprevalensi of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Amol, Northern Iran. *Life Sci J*. 2013; 10(2):164-168.
4. Nam, H. W. GRA protein of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*. 2009; 42:29-37.
5. Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol*. 1998; 84:862-865.
6. Winarno, Y., Pola epidemiologi toksoplasmosis di Surabaya (Studi Seroepidemiologi Toksoplasmosis pada Pekerja Rumah Potongan Hewan dan Penjual Daging Kambing). *Abstrak Penelitian Kesehatan 2006*. 2006; 25:205.
7. Ishaku BS, Ajogi I, Umoh JU, Lawal, I, Randawa AJ. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among antenatal women in Zaria, Nigeria. *Res J Med and Med Sci*. 2009; 4(2):438-488.
8. Black, M. W., Boothroyd, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(3):607-623.
9. Baratawidjaja, K. G. *Imunologi dasar edisi ketujuh*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 2006.
10. Yunrisma. 2010 Infeksi *Toxoplasma*. <http://?taniania.wordpress.com/2012/10/08/Infeksi-toksoplasmosis-selama-masa-kehamilan/>. Diakses 11 Januari 2014.
11. Hatam, G., Shamseddin, A. and Nikouee, F.. Seroprevalence of toxoplasmosis in High School Girls in Fasa District, Iran. *IJI*. 2005; 2(3).
12. Gangneux RF, and Marie LD. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(2): 264
13. Manik, A. M., Oka, I. B. M., dan Dwinata, I. M. Bioassay *Toxoplasma gondii* pada kucing. *Indonesia Medicus Veterinus*. 2013; 2(1):12-31
14. Artama, W.T., Haryanto, A., Widayanti, R. and Iskandar, T. Toksoplasmosis di Indonesia serologis dan biomolekular diagnostik. *Laporan Hibah Departemen Pertanian Republik Indonesia*, 2008.
15. Leblebicioglu, H. 2008. Toksoplasmosis. <http://www.emedicine.medscape.com/article/1000028>. Diakses tanggal 23 Mei 2009.

KLONING GEN *wingless-type MMTV integration site family member 4 (Wnt4)* MENCIT SWISS WEBSTER UNTUK PENYEDIAAN ANTIGEN BARU DALAM IMUNOKONTRASEPSI

Agung J. Sitaswi¹, Wayan T. Artama², Agung Budiyanto³, Edi Dharmana⁴

¹Program Studi S3 Sain Veteriner FKH UGM Yogyakarta, ²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta, ³Bagian Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta, ⁴Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang

E-mail: agssiwi@yahoo.co.id

A B S T R A K

Latar Belakang: Imunokontrasepsi merupakan proses yang menggunakan sistem imun dalam tubuh untuk menghalangi fertilitas. Konsep imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi dan mengidentifikasi protein atau gen yang berperan penting dalam salah satu tahap proses reproduksi untuk digunakan sebagai antigen. Gen *Wnt4* merupakan regulator proses implantasi embrio mencit dan manusia tetapi belum dikembangkan sebagai sumber antigen dalam imunokontrasepsi. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengeksplorasi sumber antigen baru dalam imunokontrasepsi melalui kloning gen *Wnt4* yang diisolasi dari mencit Swiss Webster.

Metode: Sumber RNA diisolasi dari *implantation site* uterus mencit Swiss Webster dengan usia kebuntingan tujuh hari. Sintesis *cDNA* dilakukan dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR), selanjutnya gen *Wnt4* diamplifikasi dengan menggunakan primer *forward* 5'-ACGTGCGAGAACTCAAAGG-3' dan primer *reverse* 5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan suhu *annealing* 57 °C selama 1 menit. Kloning produk PCR dilakukan pada vektor *pET SUMO* dan ditransformasi pada *E.coli* BL21. Transformasi DNA plasmid dilakukan menggunakan *The Champion pET SUMO Protein Expression System*. Hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB padat yang telah diberi kanamisin dengan konsentrasi 1:1000. Analisis DNA *insert* dilakukan dengan cara mengisolasi DNA plasmid rekombinan dari masing-masing klon kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen dengan RT-PCR. Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1.5%, selanjutnya divisualisasi pada *transluminator* ultraviolet. Hasil visualisasi produk RT-PCR menunjukkan *band* berukuran 400bp.

Hasil: Klon *E.coli* pembawa DNA plasmid rekombinan yang berhasil tumbuh sebanyak 13 klon, masing-masing menunjukkan *band* dengan ukuran 6036 bp. Hasil amplifikasi dan visualisasi DNA plasmid rekombinan menunjukkan *band* dengan ukuran 400 bp berhasil *insert* pada sembilan klon.

Simpulan: Keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kloning gen *Wnt4* mencit Swiss Webster telah berhasil dilakukan.

Kata kunci: kloning, *Wnt4*, imunokontrasepsi, *pET SUMO*, *E.coli* BL21

PENDAHULUAN

Imunokontrasepsi merupakan proses yang menggunakan sistem imun dalam tubuh untuk menghalangi fertilitas.^{1,2,3,4,5} Konsep imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi dan mengidentifikasi protein yang berperan penting dalam salah satu tahap proses reproduksi untuk digunakan sebagai antigen.^{6,7,8} Sumber antigen yang telah dikembangkan dalam metode imunokontrasepsi menggunakan salah satu molekul yang berasal dari produksi, fungsi dan *outcome* gamet.^{9,10}

Konsep penyediaan antigen dalam pengembangan metode imunokontrasepsi merupakan proses rekayasa genetika^{9,11,12}. Proses tersebut juga dikenal sebagai kloning gen, manipulasi gen, teknologi DNA rekombinan, serta modifikasi genetik^{12,13}. Teknologi DNA rekombinan telah digunakan untuk mempelajari sejumlah proses reproduksi, baik dalam menganalisis ciri spesifik hormon maupun gamet^{11,14,15,16}.

Beberapa peptida telah berhasil diisolasi terekspresi dalam proses reproduksi serta terbukti dapat dijadikan agensia imunokontrasepsi, terutama pada tikus dan kelinci. Peptida tersebut adalah GMCSF⁶, 27 kDa HSP plasenta, LIFR¹⁷, OGP, PLF, PRL, SP56 dan sub unit 1 dan 3 protein ZP^{6,10,18,19}, BMP atau GDF9²⁰, GnRH^{19,21,22, 23, 24}. Materi antigen yang sangat dikembangkan sampai saat ini adalah protein ZP dan protein GnRH dengan sasaran hewan jantan, tetapi vaksin imunokontrasepsi yang menggunakan ZP dan GnRH tidak spesies spesifik serta tidak menimbulkan efek yang berkelanjutan^{19,25}.

Ekspresi gen spesifik dalam uterus selama periode kritis implantasi embrio merupakan sumber antigen baru yang potensial untuk pengembangan metoda imunokontrasepsi^{6,26,27}, terutama pada hama spesies mamalia^{26,27}. Protein yang terekspresi dalam uterus juga

merupakan sumber antigen kontraseptif non-hormonal²⁶. Saat ini telah diidentifikasi 76 faktor (berupa sitokin, kemokin, GF) yang berperan dalam beberapa tahap perkembangan kebuntingan pada hewan atau kehamilan pada manusia, tetapi belum diesplorasi menjadi antigen dalam imunokontrasepsi²⁷.

Ekspresi sejumlah gen penyandi beberapa molekul yang berperan penting dalam proses implantasi di dalam jaringan uterus selalu mengalami perubahan^{27,28}. Salah satu regulator dalam proses implantasi embrio pada mencit adalah gen *wnt*^{27,28,29,30}. Gen *wnt* beraksi pada beberapa tahap perkembangan awal embrio dengan mengekspresikan protein yang berperan dalam sistem sinyal dalam sel^{28, 29}. Protein *wnt* melalui sistem sinyal selular berperan dalam proses perkembangan fundamental yaitu determinasi nasib sel, proliferasi, polaritas, dan kematian sel selama perkembangan embrio^{28,29,31,32,33,34}. Eskpresi *Wnt4* hanya terjadi pada *implantation site*, tidak ditemukan pada *nonimplantation site*²⁹. Sistem sinyal yang diregulasi oleh protein *wnt* berperan dalam perkembangan embrionik, dalam aktivasi blastokista, implantasi dan desidualisasi^{35,36}. Sistem sinyal *wnt* terjadi sepanjang perkembangan embrio sehingga memberi bukti bahwa sistem sinyal *wnt* memiliki sejumlah peran dalam perkembangan embrio³⁷.

Gen *Wnt4* telah diidentifikasi pada manusia dan mencit²⁸. Isolasi dan deteksi ekspresi gen *Wnt4* pada mencit telah berhasil dilakukan dengan teknik RT-PCR^{28,29,38}. Teknik PCR juga telah digunakan pada isolasi dan amplifikasi gen *Wnt4* pada epididimis kera dan rodensia³⁸. Isolasi dan kloning gen *Wnt4* dengan sumber RNA berasal dari *Taenia solium* pada vektor pMD18-T, kemudian ditransformasi ke dalam sel-sel kompeten *Escherichia coli* DH5 α telah berhasil dilakukan³⁹. Isolasi dan amplifikasi gen *Wnt4*

pada *Epinephelus coioides* juga telah berhasil dilakukan⁴⁰.

Sumber, fungsi dan mekanisme aksi protein *Wnt4* telah diketahui dengan pasti. Isolasi, deteksi ekspresi, amplifikasi dan kloning gen *Wnt4* telah berhasil dilakukan pada beberapa spesies, tetapi belum dikembangkan sebagai antigen dalam imunokontrasepsi. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengeksplorasi sumber antigen baru dalam imunokontrasepsi melalui kloning gen *Wnt4* yang diisolasi dari mencit Swiss Webster. Keberhasilan kloning gen *Wnt4* membuka peluang untuk digunakan sebagai antigen baru dalam metode imunokontrasepsi untuk meregulasi fertilitas hewan, terutama hewan liar yang berperan sebagai hama atau reservoir penyakit menular.

METODE

1. Isolasi RNA *Wnt4*

Isolasi RNA dilakukan dengan *Total Isolation Kit* (FTRI-25, SBS Genetech). *Implantation site* pada uterus hewan coba yang telah dikawinkan, diisolasi pada hari ke-tujuh kebuntingan. Sampel uterus ditimbang sebanyak 100 mg, dimasukkan ke dalam nitrogen cair dan segera dihancurkan dengan menggerus (*grinding*) menggunakan mortar. Uterus yang telah hancur ditambah 1ml redzol, dihomogenisasi dan segera didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit. Campuran uterus dan redzol ditambah dengan 0,2 ml chloroform, divortex, didiamkan 3 menit pada suhu kamar, selanjutnya disentrifus selama 15 detik dengan kecepatan 12000 rpm sampai terbentuk 3 fase. Fase atas dipindahkan ke tabung eppendorf 1.5 ml, ditambah 200 µl dan dihomogenkan. Campuran segera dipindah ke dalam *Membran Spin Column* didiamkan selama 3 menit, disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terkumpul di bagian bawah tabung eppendorf

dibuang, membran dipindahkan ke tabung 1.5 ml dan ditambah 600 µl RNA *washing buffer*. Membran disentrifus ulang selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terbentuk dibuang, tabung kembali disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Membran dipindah ke tabung 1,5 ml kemudian ditambah 50 µl DEPC, didiamkan 1-2 menit, disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Membran ditambah 30 µl DEPC, didiamkan 2 menit, disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang tertampung setelah sentrifus terakhir merupakan RNA, disimpan pada suhu -20 ° C sampai digunakan untuk RT-PCR. Konsentrasi RNA ditentukan dengan rumus sebagai berikut: $[RNA] = OD_{260} \times P \times 40 \mu\text{g/ml}$ (OD: *Optical Density*; P: Pengenceran: 40: Konstanta untuk RNA)⁴¹.

2. Amplifikasi gen *Wnt4*

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin Amplitron1 dengan volume reaksi yang terdiri dari 2 µL PCR mix, 2 µL primer forward, 2 µL primer reverse, 17 µL ddH₂O, 2 µL DNA *template*, dan 2µL DMSO.

Kondisi optimum sintesis DNA pada saat optimasi diperoleh pada suhu 57 °C selama 30 menit, sintesis cDNA dilakukan selama 30 menit pada suhu 57 °C, amplifikasi sebanyak 35 siklus dengan predenaturasi selama 5 menit pada suhu 94 °C, setiap siklus terdiri atas denaturasi selama 1 menit pada suhu 94 °C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 57 °C, dan *extension* selama 1 menit pada suhu 72 °C. Tahap ekstensi diperpanjang selama 10 menit pada suhu 72 °C. Selanjutnya tabung didinginkan pada suhu 4 °C selama 4 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1.5% dan pengamatan dilakukan menggunakan transluminator UV yang memperlihatkan band yang spesifik dengan ukuran 400 bp yang siap untuk dikloning.

Tabel 1. Primer yang digunakan pada penelitian (Hayashi *et al.*, 2009)

Primer	Sekuen	Tm (°C)
Forward	5'-ACGTGCGAGAACTCAAAGG-3'	55,6
Reverse	5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'	57,8

Amplikon produk PCR dikirim ke *Ist Base Laboratories* Singapura untuk *sequencing*. Program *sequencing* dilakukan dengan menggunakan ABI PRISM 3730xL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, USA). Algoritma hasil *sequencing* dianalisis dengan program BLAST. Hasil BLAST dinyatakan dengan persentase homologi antara sekuen DNA sampel yang dianalisis dengan sekuen *data base* dalam NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. Kloning gen *Wnt4*

Prosedur kloning dilakukan melalui proses ligasi dan transformasi. Proses ligasi dilakukan untuk memperoleh DNA plasmid dengan komposisi: 2 µL produk PCR, 1 µL *ligation buffer*, 2 µL pET SUMO vektor, 1 µL *T4 DNA ligase* dan 4 µL H₂O steril. DNA plasmid diinkubasi pada suhu 12°C *overnight*, selanjutnya DNA plasmid ditransformasi menggunakan *The Champion pET SUMO Protein Expression System*.

Transformasi dilakukan dengan mengambil tabung berisi *E.coli* BL21, ditambahkan 5 – 10 ng DNA plasmid dengan menggunakan *pipette tip*, selanjutnya diinkubasi dalam es selama 30 menit. Tabung berisi *E.coli* dan DNA plasmid selanjutnya diberi kejutan panas (*heat shock*) dengan menempatkan tabung pada suhu 42 °C selama 30 detik yang kemudian segera disimpan ke dalam tabung es. Ditambahkan 250 µL SOC medium, tabung ditutup dengan erat dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 1 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm. Hasil reaksi transformasi disimpan pada suhu 2°C dan siap untuk dikultur pada media LB padat. Hasil transformasi disebut transforman.

a. Analisis DNA insert

Hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB padat dengan cara meratakan koloni pada media LB padat yang telah diberi kanamycin dengan konsentrasi 1:1000 (kanamisin:media LB) dalam cawan petri. LB padat yang telah ditanami dengan transforman, diinkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath* selama 1 malam. Dilakukan pengamatan terhadap koloni transforman pada media LB padat.

Koloni putih yang tunggal pada media LB pada diisolasi dan dipindahkan pada tabung yang berisi 5 mL media LB cair, diinkubasi selama 1 malam pada *waterbath* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm. DNA yang berhasil insert pada plasmid dideteksi dengan cara mengisolasi DNA plasmid dari masing-masing klon, kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer yang sama seperti yang digunakan dalam amplifikasi gen *Wnt4*.

b. Isolasi DNA plasmid

Satu koloni dari media LB dipindahkan ke dalam media LB cair, diinkubasi dan *dishaker* dengan kecepatan 40 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteri pada media LB cair dipindahkan ke dalam tabung *microcentrifuge*, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian 200 µL *buffer* PD1 yang telah ditambahkan RNase A ditambahkan pada tabung *microcentrifuge* dan pellet disuspensikan dengan menggunakan vortex. Dapar PD2 sebanyak 200 µL ditambahkan pada tabung dan dicampur dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 10 kali. Dapar PDS sebanyak 300 µL dipipet

dan dicampurkan pada kemudian dibolak-balik sebanyak 10 kali, disentrifugasi 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang terbentuk setelah sentrifugasi dipindahkan ke *PD column* dari *microtube*, diulangi sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Bagian bawah *PD column* dibuang, *PD column* kembali ditempatkan pada *collection tube* 2 mL. *Wash buffer* yang telah dicampur ethanol dipipet sebanyak 600 µl ditambahkan pada *PD column* kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Bagian bawah *PD column* dibuang dan diletakkan kembali pada 2 mL *collection tube*, disentrifugasi 14.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan *matrix column*. DNA yang berhasil diisolasi disimpan pada suhu -20 °C.

c. Amplifikasi DNA insert

Amplifikasi DNA insert dilakukan dengan menggunakan mesin Amplitron® dengan volume reaksi 25 µL yang terdiri dari 12,5 µL PCR mix, 2 µL primer forward, 2 µL primer reverse, 5,5 µL ddH₂O, 2 µL DNA template. Kondisi PCR dilakukan dengan predenaturasi selama 5 menit pada suhu 94°C, denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 57°C, dan *elongasi* selama 1 menit pada suhu 72°C. Tahap *elongasi* diperpanjang selama 10 menit pada suhu 72 °C. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 40 siklus. Selanjutnya tabung didinginkan pada suhu 4 °C selama 4 menit.

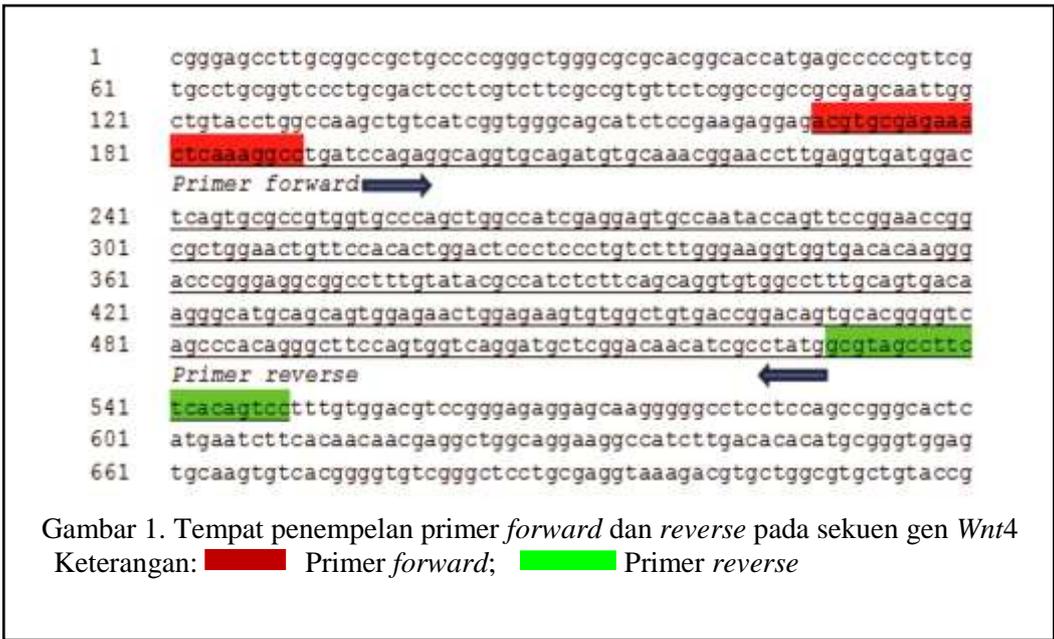
Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1.5%. Pembuatan gel elektroforesis dilakukan dengan menimbang 0,175 gram *agarose* dan dilarutkan dengan dapar TBE 25 mL dalam erlenmeyer 50 mL, dididihkan menggunakan *autoclave* dan didiamkan sampai

suhu mencapai 50°C. Ditambahkan 1 µL DNA *fluorosafe* (1st Base) kemudian dihomogenkan. Cetakan gel dan sisir diatur kemudian larutan gel dituang ke dalam cetakan sampai gel mengalami polimerisasi. *Chamber* elektroforesis diisi dengan 1x dapar TBE. Sisir dilepaskan dari gel dan gel ditempatkan dalam *chamber* elektroforesis. Sampel DNA dicampur dengan *DNA loading dye* dengan perbandingan 1: 4 (*DNA loading dye*: sampel DNA), diisikan pada sumuran dalam gel masing-masing sebanyak 10 µL. Sumuran pertama digunakan untuk DNA marker (Sigma®), sumuran berikutnya digunakan untuk DNA sampel. Gel dirunning pada 100mV selama 30 menit. Gel divisualisasi pada *transluminator* UV untuk mengamati band yang spesifik untuk *Wnt4* yaitu 400 bp.

HASIL

1. Amplifikasi dan Sekuensing Gen *Wnt4*

Isolasi total RNA dengan *Total Isolation Kit* (FTRI-25, SBS Genetech), sintesis cDNA dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan amplifikasi gen *Wnt4* dengan menggunakan primer *forward* 5'-ACGTGCGAGAACTCAAAGG-3' dan *reverse* 5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3' telah berhasil dilakukan. Hasil BLAST sekuen primer yang digunakan pada *data base* dalam NCBI menunjukkan hasil bahwa primer tersebut merupakan primer yang tepat untuk amplifikasi gen *Wnt4* sehingga dapat menempel pada sekuen nukleotida gen *wnt4* (Gambar 1).

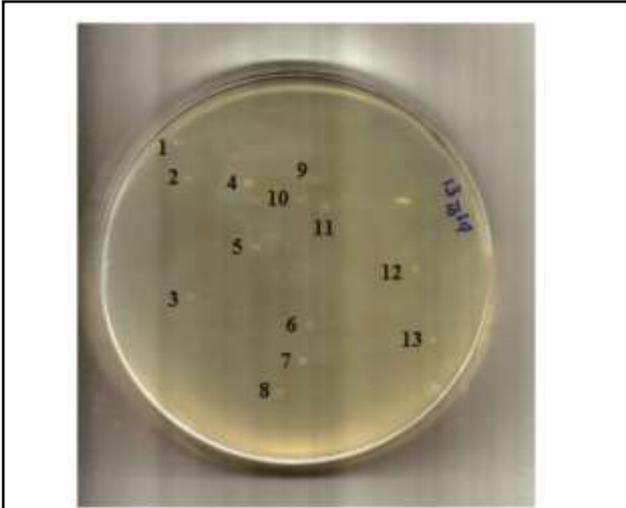


Hasil amplifikasi gen *Wnt4* dan hasil elektroforesis pada gel agarosa 1,5% menunjukkan bahwa gen *Wnt4* mencit strain Swiss Webster berhasil diamplifikasi menggunakan primer yang digunakan Hayashi *et al.* (2009)²⁹ sehingga menyebabkan munculnya *band* dengan ukuran 400 bp (hasil tidak ditampilkan). Hasil sekuensing dengan primer *forward* menunjukkan panjang nukleotida 393 bp sedangkan menggunakan primer *reverse* menunjukkan 394 bp. Hasil BLAST pita ukuran 400 bp menunjukkan bahwa sekuen tersebut merupakan sekuen gen *Wnt4 M.musculus L.* Sekuen gen *Wnt4* juga ditunjukkan dengan persentase homologi antara sekuen DNA sampel yang dianalisis dengan sekuen *database* dalam NCBI (NM_009523.2), yang menunjukkan signifikansi urutan nukelotida 99% dengan *Mus musculus wingless-related MMTV integration site member 4.*

2. Kloning gen *Wnt4*

Kloning sekuen gen *Wnt4* menggunakan *pET SUMO* sebagai vektor pengekspresi dan *E.coli BL21* sebagai sel kompeten telah berhasil dilakukan. Sekuen gen *Wnt4* hasil amplifikasi diligasi pada plasmid

sehingga terbentuk plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan selanjutnya ditransformasi ke dalam *E.coli BL21*. *E.coli* pembawa plasmid rekombinan ditumbuhkan pada media LB padat yang telah diberi antibiotik kanamycin dengan konsentrasi 1:1000. Kultur *E.coli* pada media LB padat dilakukan selama satu malam pada suhu 37°C dalam *waterbath*. Hasil kultur *E.coli* pembawa plasmid rekombinan menunjukkan 13 koloni putih yang berhasil tumbuh, disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E.coli BL21*. Keterangan: Angka menunjukkan jumlah klon yang tumbuh pada media LB padat

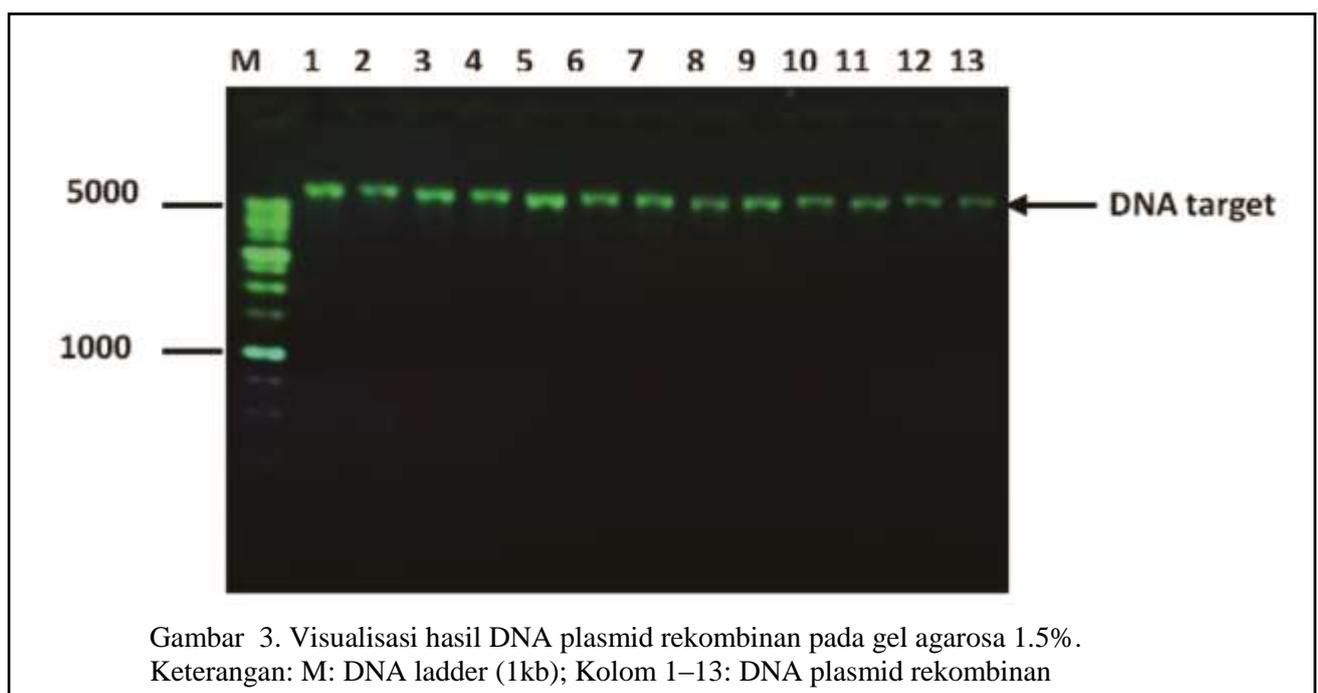
Koloni putih hasil transformasi ditumbuhkan dalam 5 ml media LB cair, pada *waterbath* pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Isolasi DNA plasmid rekombinan dilakukan setelah *E.coli* pembawa DNA rekombinan diinkubasi selama 1 malam. Hasil isolasi DNA plasmid rekombinan di-*running* pada gel agarosa 1.5% dan divisualisasikan pada transluminator ultraviolet, disajikan pada Gambar 3. Hasil visualisasi menunjukkan DNA plasmid rekombinan berhasil diisolasi dari semua sampel *E.coli* transforman (nomor sampel 1 sampai 13).

Deoxyribo nucleic acid (DNA) plasmid rekombinan diamplifikasi dengan PCR pada suhu *annealing* 57 °C menggunakan primer yang sama dengan amplifikasi gen *Wnt4* dengan RT-PCR. Running DNA dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1.5% dengan volume loading sampel sebanyak 10µl dan divisualisasikan pada iluminator ultraviolet. Hasil visualisasi menunjukkan fragmen DNA produk PCR berhasil *insert* pada DNA plasmid, ditunjukkan dengan *band* dengan ukuran 400bp, disajikan pada Gambar 4. Hasil DNA insert dengan ukuran 400bp

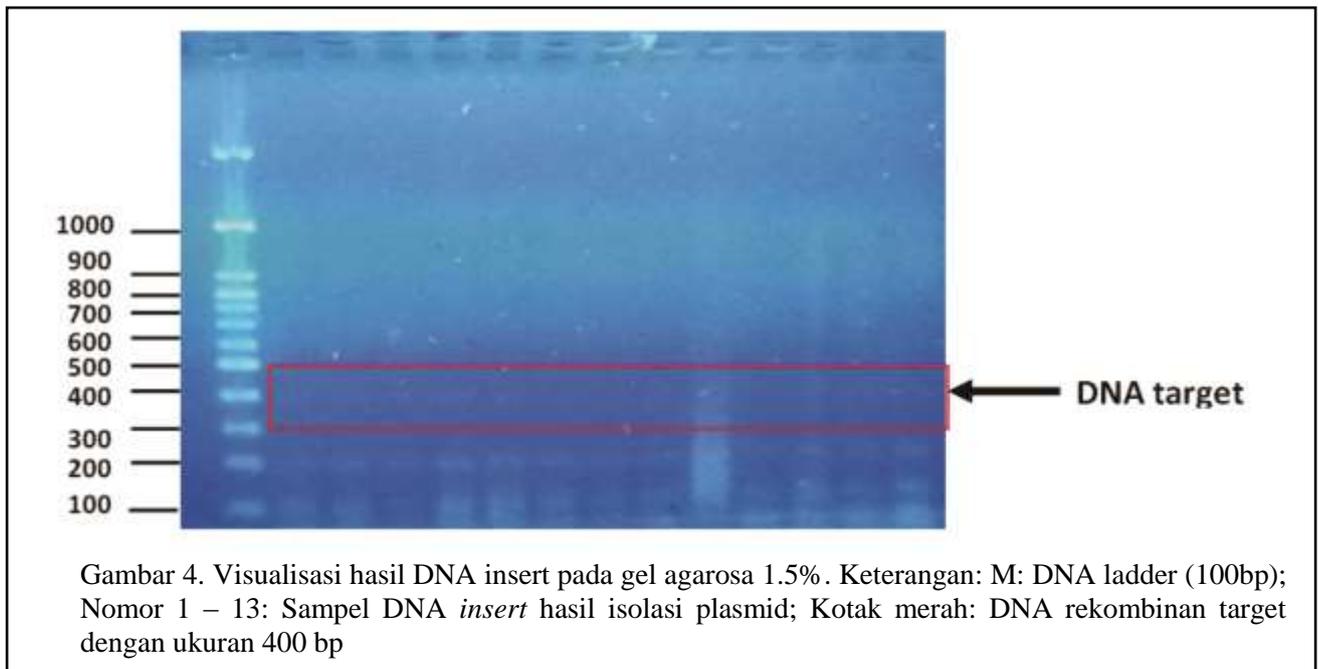
ditunjukkan pada klon no 1,2,3,4,5,6,11,12,13 (kotak merah).

PEMBAHASAN

Primer yang digunakan dalam penelitian ini terbukti dapat mengamplifikasi sekuen nukleotida gen *Wnt4*, ditunjukkan dengan *band* yang berukuran 400 bp (hasil tidak ditampilkan). Pemilihan dan penggunaan primer pada RT-PCR telah dirancang agar dapat melekat pada sekuen nukleotida yang diharapkan sehingga gen target dapat teramplifikasi sempurna. Daerah penempelan primer terletak pada urutan pasangan basa ke-169 sampai ke-550 sehingga panjang sekuen yang teramplifikasi adalah 381 pasangan basa. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Hayashi *et al.*²⁹. Primer harus mengapit urutan sekuen target, sehingga urutan sekuen yang akan diamplifikasi dapat diperoleh dengan tepat^{13,42}. Ketepatan penempelan primer merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan amplifikasi sekuen DNA^{13 43,44}.



Gambar 3. Visualisasi hasil DNA plasmid rekombinan pada gel agarosa 1.5%. Keterangan: M: DNA ladder (1kb); Kolom 1–13: DNA plasmid rekombinan



Hasil optimasi pada penelitian ini menunjukkan gen dapat teramplifikasi dengan kondisi optimum pada suhu *annealing* 57°C. Penelitian Muhammed *et al.* (2004) dengan suhu *annealing* 60°C dan menghasilkan 344 bp²⁸, sedangkan penelitian Hayashi *et al.* (2009) dengan suhu *annealing* 55°C menghasilkan 381 bp²⁹, sehingga dapat disimpulkan bahwa perbedaan suhu *annealing* dalam penelitian ini kemungkinan menjadi penyebab primer dapat mengamplifikasi dua gen secara bersamaan. Perbedaan suhu *annealing* pada penelitian ini tetap memberi kepastian bahwa hasil amplifikasi adalah gen *Wnt4* dengan ukuran 400 bp. Hal tersebut ditunjukkan dengan signifikansi urutan nukleotida 99% dengan *Mus musculus wingless-related MMTV integration site member 4* pada hasil BLAST sekuen nukleotida gen *Wnt4* yang diperoleh (NM_009523.2).

Plasmid merupakan vektor pengekspresi yang paling umum digunakan dalam proses kloning gen. Plasmid yang saat ini umum digunakan sebagai vektor kloning adalah *pET* yang mampu menghasilkan 15-60 kopi dalam

tiap sel. Plasmid ini juga memiliki replikon, suatu daerah pada DNA plasmid yang terdiri dari *origin of replication* dan *cis-acting control elements*. Replikon menentukan jumlah kopi DNA yang dapat dilakukan oleh plasmid⁴⁵. Plasmid *pET* juga memiliki sejumlah elemen penting untuk ekspresi gen, yaitu *lacI* gene, sebuah promoter T7 yang spesifik untuk T7 RNA *polymerase* dan *lac* operator yang dapat menahan transkripsi, sebuah *ampicillin resistance gene*, serta dua daerah *origin of replication* (*ori*) yaitu *f1* yang dalam kondisi tertentu dapat menghasilkan vektor untai tunggal, serta daerah *origin of replication* yang konvensional⁴⁵.

Plasmid *pET SUMO* pada penelitian ini memiliki nukleotida 5643 sehingga hasil insersi produk PCR membentuk DNA rekombinan dengan ukuran $\pm 6036-6037$ bp. Pembentukan DNA rekombinan dapat terjadi karena *pET SUMO* memiliki *cloning site* pada basa 653-654, disajikan pada Gambar 5. Insersi hasil PCR membentuk DNA plasmid rekombinan pada *pET SUMO* dapat terjadi karena *Taq polymerase* memiliki aktivitas *nontemplate-dependent* yang menambahkan

deoxyadenosine tunggal (A) pada ujung 3' produk PCR. Sebaliknya, vektor *pET* memiliki residu *deoxythymidine* yang memungkinkan produk PCR *insert* dan ligasi secara efisien ke dalam vektor⁴⁶. Hasil penelitian pada Gambar 4 menunjukkan efektifitas insersi produk PCR ke dalam plasmid yang tinggi yaitu sekitar 70% (sembilan dari 13 koloni).

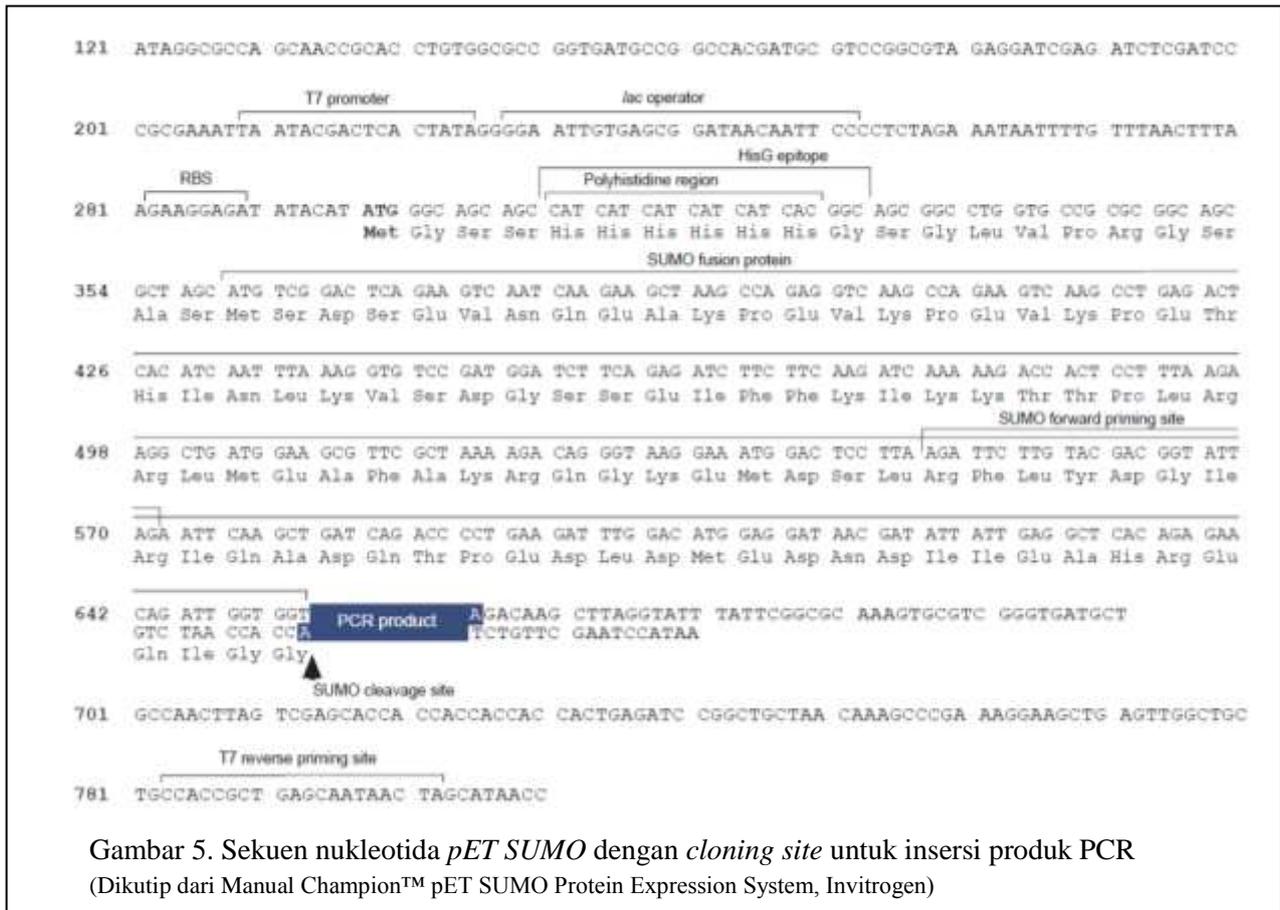
Tahap selanjutnya dalam kloning gen adalah proses transformasi. Proses ini merupakan proses memindahkan plasmid rekombinan ke dalam sel inang. Proses transformasi biasanya dilakukan dengan menambahkan larutan CaCl atau 'heat shocking' sehingga DNA asing dapat masuk ke dalam sel bakteri sebagai sel kompeten^{42,47,48}. Proses transformasi pada penelitian ini dilakukan dengan kejutan panas (*heat shocking*), dengan cara memindahkan campuran plasmid dan sel kompeten *E.coli* BL21 dari suhu rendah (es) ke suhu 42 °C kemudian kembali ke suhu rendah (tabung es). *Heat shocking* menyebabkan stabilitas membran sel bakteri terganggu sehingga memungkinkan DNA plasmid yang beragregasi dengan Ca²⁺ dipermukaan sel, menembus membran dan masuk ke dalam sel^{42,48,49,50}.

Reproduksi sekuen DNA yang dicari/diklon dapat dengan dilakukan dengan mengkultur bakteri pembawa plasmid rekombinan^{47,50,51}. Kultur *E. coli* yang digunakan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan dapat dilakukan dengan *tryptone-phosphate* yang mengandung antibiotik tertentu^{49,52,53}. Pemberian antibiotik dilakukan untuk *screening* keberhasilan rekombinasi dan transformasi DNA^{7,47,48,50,51,53}. Antibiotik yang diberikan pada penelitian adalah kanamycin. Plasmid *pET* SUMO merupakan plasmid yang memiliki gen yang resisten terhadap kanamycin pada urutan basa 1431-2246, sehingga pemberian kanamycin dalam

penelitian ini sebagai *screening* keberhasilan rekombinasi DNA telah tepat dilakukan. Hasil dari interaksi kanamycin dalam media LB dengan gen yang resisten terhadap kanamycin pada plasmid ditunjukkan oleh keberadaan 13 klon yang mampu tumbuh pada media LB padat dengan penambahan kanamycin (dalam Gambar 2) adalah klon yang mengandung DNA plasmid (pada Gambar 3).

Escherichia coli merupakan mikrobial yang paling umum digunakan untuk manipulasi DNA sebagai vektor pengeksresi protein rekombinan. Penggunaan *E.coli* dilakukan dengan pertimbangan kemudahannya untuk dikultur dan berkembang dalam medium yang sederhana^{50,51}. *Escherichia.coli* memiliki siklus hidup yang pendek karena mampu membelah dalam waktu 20 menit^{12, 45}. Selain hal tersebut, informasi mengenai gen dalam *E.coli* juga relatif lengkap sehingga dapat dilakukan sejumlah rekayasa dengan teknik yang sangat bervariasi^{12,47,48,49,55}.

Penggunaan *E. coli* sebagai inang pada kloning gen dalam penyediaan antigen untuk imunokontrasepsi telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Zhang *et al.* (1999) menggunakan *E.coli* untuk mendapatkan protein rekombinan hasil konjugasi empat atau enam *moieties* LHRH pada ovalbumin⁵⁶. *Escherichia coli* sebagai vektor juga telah digunakan untuk mengekspresikan ZP1 dari *Macaca radiata*¹⁴, ZP3 dan ZP2⁵⁷, protein rekombinan bmZP1 (132–147 aa), bmZP2 (86–113 aa) dan bmZP3 (324–347aa)⁵⁸. *E.coli* BL21 dan derivatnya merupakan strain *E.coli* yang baik untuk ekspresi protein rekombinan^{49,55,59,60,61,62}.



UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Direktur BPPS, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan bantuan dana pendidikan selama masa studi di Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Gadjah Mada (UGM).
2. Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama selaku Promotor yang telah membimbing dan memberikan pengarahan serta memberi kemudahan pada penulis dalam pengadaan alat dan bahan yang diperlukan untuk kloning gen *Wnt4* di Bagian Biokimia FKH UGM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Smith G, Walmsley A, Polkinghorne I. Plant-derived immunocontraceptive vaccine. *Reprod Fertil Steril.* 1997;9(1):85–90.
2. Purswell BJ, KA Kolster KA. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology.* 2006;66:510–513.
3. Powers JG, Baker DL, Davis TL, Conner MM, Lothridge AH, Nett TM. Effects of gonadotropin-releasing hormone immunization on reproductive function and behavior in captive female rocky mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Biol Reprod.* 2011;85:1152–1160.
4. Samoylova TI, et al. Phage display allows identification of zona pellucida-binding peptides with species-specific properties: Novel approach for development of contraceptive vaccines for wildlife. *J Biotechnol.* 2012;162:311–318.
5. Kachani M, Heath D. Dog population management for the control of human echinococcosis. *ActaTropicalia.* 2014;39:99–108.

6. Nie, Gui-Ying, Butt AR, Salamonsen LA, Findlay JK. Hormonal and non hormonal agents at implantation as targets for contraception. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9:65–76.
7. Robinson AJ, Jackson R, Kerr P, Merchant J, Parer I, Pech R. Progress toward using recombinant myxoma virus as vector for fertility control in rabbits. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9:77-83.
8. Bowen RA. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Anim Reprod Sci.* 2006;105:139–143.
9. Holland MK, Andrews J, Clarke H, Wayton C, Hinds LA. Selection Of Antigens For Use In A Virus-Vectored Immunocontraceptive Vaccine: PH-20 as a case study. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9(1): 117-124.
10. Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, Vyas HK, Talwar GP. Recent advances in contraceptive vaccine development: A mini review. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3271–3283.
11. Saito-Diaz K, et al. Cloning of complementary DNAs encoding structurally related homeoproteins from preimplantation Mouse embryos: Their involvement in the differentiation of embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2010;82:687–697.
12. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2013;32(6):419-25.
13. Nicholl DST. An introduction to genetic engineering. Third edition. Cambridge University Press. New York. 2008:12-50.
14. Govind CK, Gupta SK. Failure of female baboons (*Papio anubis*) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zona pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine.* 2000;18:2970–2978.
15. Clydesdale G, Pekin J, Beaton S, Jackson RJ, Vignarajan S, Hardy CM. Contraception in mice immunized with recombinant zona pellucida subunit 3 proteins correlates with Th2 responses and the levels of interleukin 4 expressed by CD4⁺ cells. *Reprod Fertil.* 2004;128: 737-745.
16. Tubbs C, McDonough CM, Felton R, Milnes MR. Advances in conservation endocrinology: The application of molecular approaches to the conservation of endangered species. *Review. General and Comparative Endocrinology.* 2014;203:29–34.
17. Hu, Wenwei, Zhaohui F, Angelika KT, Levine AJ. p53 Regulates Maternal Reproduction Through LIF. *Nature.* 2007;450:721–724.
18. Lou Y, Ang J, Thai H, McElveen F, Tung KS. A zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology. *J Immunol.* 1995;155:2715–2720.
19. Gupta A, Pal R, Ahlawat S, Bathia P, Singh O. Enhanced immunogenicity of a contraceptive vaccine using diverse synthetic carriers with permissible adjuvant. *Vaccine.* 2011;19:3384–3389.
20. McNatty KP, et al. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol Reprod.* 2007;76:552–560.
21. Fayrer-Hosken RA, Bertschinger HJ, Kirkpatrick JF. Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology.* 1999;52:835–846.
22. Khan MAH, Ogita K, Ferro VA, Kumasawa K, Tsutsui T, Kimura T. Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. *Vaccine.* 2008;26:1365—1374.
23. Donovan CE, Hazzard T, Schmidt A, LeMieux J, Hathaway F, Kutzler MA. Effects of a commercial canine gonadotropin releasing hormone vaccine on estrus suppression and estrous behavior in mares. *Animal Reprod Sci.* 2013;142:42–47.
24. Shrestha A, Wadhwa N, Gupta SK. Evaluation of recombinant fusion protein comprising dog zona pellucida glycoprotein-3 and Izumo and individual fragments as immunogens for contraception. *Vaccine.* 2014;32: 564–571.
25. McLaughlin EA, Aitken RJ. Is there a role for immunocontraception? A Review. *Mol Cel Endocrinol.* 2011;335:78–88.
26. Lemons AR, Naz RK. Contraceptive vaccines targeting factors involved in establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(1):13–25.
27. Muhamed OA, Dufort D, Clarke HJ. Experimental and estradiol regulation of *Wnt* genes in the mouse blastocyst. Identity a candidate pathway of embryo-maternal signalling at implantation. *Biol Reprod.* 2004;71:417-424.
28. Hayashi K, et al. 2009. *Wnt* Genes in the Mouse Uterus: Potential Regulation of

- Implantation. *Biol Reprod.* 2009;88:989–1000.
29. Hsieh M, et al. Mice Null for Frizzled4 (*Fzd4* /) Are Infertile and Exhibit Impaired Corpora Lutea Formation and Function. *Biol Reprod.* 2005;73:1135–1146.
 30. Cory A, Paquet M, Behringer R, DeMayo F, Richards JA, Boerboom D. *Wnt4* expression in ovarian granulosa cell precursors is required for follicle formation. *Biol Reprod.* 2007;77:133–136.
 31. He X, Saint-Jeannet JP, Wang D, Nathans J, Dawid J, Varmus H. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5a. *Science.* 2007;275:1652–1654.
 32. Paria BC, Reece J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science.* 2002;296:2185–2188.
 33. Miller JR. The Wnts. *Gen Biol* 2002;3:3001–3015.
 34. Saito-Diaz K, et al. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors.* 2014;31(1):1–31.
 35. Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation: A Review. *Placenta.* 2010;31:839–847.
 36. Li W, Zhang Y, Zhang M, Huang G, Zhang Q. *Wnt4* is overexpressed in human pituitary adenomas and is associated with tumor invasion. *J Clin Neurosci.* 2014; 21:137–141.
 37. McAuley BS, Akyar E, Filliger L, Hinman VF. Expression of wnt and frizzled genes during early sea star development. *Gene Expr Patterns.* 2013;13: 437–444.
 38. Rao AJ, et al. Oestrogenic regulation and differential expression of *WNT4* in the bonnet monkey and rodent epididymis. *Reprod BioMed Online.* 2009;18(4):555–561.
 39. Hou J, Lou, et al. Sequence Analysis and Molecular Characterization of *Wnt4* Gene in Metacestodes of *Taenia solium*. *Korean J Parasitol.* 2014;52(2):163–168.
 40. Chen JG, Chen T, Ding Y, Han L, Zhou FY, Chen WZ, Ding MX. Baicalin can attenuate the inhibitory effects of mifepristone on Wnt pathway during peri-implantation period in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;149:11–16.
 41. Mulhardt C. *Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics.* Ed.4. Germany: Spektrum Akademischer Verlag. 2003: 26–27.
 42. Lodge J, Lund P, Minchin S. *Gene Cloning. Principles and Applications.* New York: Taylor and Francis. 2007: 36–47.
 43. Chen BY, Janes H.W. *PCR Cloning Protocols.* Second Edition. New Jersey: Totowa Press. New Jersey. 2003: 3–18.
 44. Yuwono T. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction.* Edisi pertama. Yogyakarta: Penerbit Andi. 2006: 1–237.
 45. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Review Article. *Frontiers Microbiol.* 2014;5:171–189.
 46. Anonim. *Manual Champion™ pET SUMO Protein Expression System.* Invitrogen. 2010.
 47. Brown TA. *Gene cloning and DNA analysis. An Introduction.* 5th Ed. Singapore: Blackwell Publ. 2006: 107–132, 220–237.
 48. Ahison AL. *Fundamental Molecular Biology.* Oxford: Blackwell Publ. 2007: 180–231.
 49. Wang H, Wang F, Wang W, Yao X, Wei D, Cheng H, Deng Z. Improving the Expression of Recombinant Proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under Acetate Stress: An Alkaline pH Shift Approach. *PLOS One.* 2014;9(11): 1–11.
 50. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4th Edition. www.whfreeman.com/lechninger4e. 2006: 306 – 330.
 51. Chedrese PJ, *Reproductive Endocrinology. A Molecular Approach.* Canada: Springer Science & Business Media. 2009: 35–53.
 52. Quesnell MM, Zhang Y, de Avila DM, Bertrand KV, Reeves JJ. Immunization of male mice with Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone fusion proteins reduces testicular and accessory sex gland function. *Biol Reprod.* 2000;63:347–353.
 53. Priya SS, et al. Over Expression of IPTG inducible GST protein in *E.coli* BL21. *J Biomed Sci Res.* 2010;2(1): 54–59.
 54. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 12th Ed. New York: Lange Medical Book. 2004: 396–414.
 55. Zhou K, Zhou L, Lim QE, Zou R, Stepahopoulos G, Too HP. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol.* 2011;12:18–27.57.
 56. Zhang Y, Rozell TG, deAvila DM, Bertrand KP, Reeves JJ. Development of recombinant ovalbumin-luteinizing hormone releasing

- hormone as a potential sterilization vaccine. *Vaccine*. 1999;17:2185–2191.
57. Srivastava N, et al. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli*-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction*. 2002;123:847–857.
58. Sivapurapu N., Upadhyay A, Hasegawa A, Koyama K, Gupta SK. Efficacy of antibodies against *Escherichia coli* expressed chimeric recombinant protein encompassing multiple epitopes of zona pellucida glycoproteins to inhibit in vitro human sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev*. 2003;65:309–317.
59. Sadeghi HMM, Rabbani M, Fazeli S. Optimization of alkaline phosphatase gene expression in *E. coli*. *Res Pharm Sci*. 2008;3(1):35-39.
60. Robichon C, Luo J, Causey TJ, Benner JS, Samuelson JC. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Appl Environment Microbiol*. 2011;77(13):4634–4646.
61. Baez A, Majdalani N, Shiloach J. Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:50-57.
62. Zhu, Bin. Bacteriophage T7 DNA Polymerase sequenase. Review Articles. *Frontiers Microbiol*. 2014;5(181):1-4.

STUDI PATOTIPING VIRUS NEWCASTLE DISEASE DARI AYAM BROILER DENGAN METODE RT-PCR DAN REA

Silvana Derivatif Kristoferin¹ dan Aris Haryanto²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: silvana.derivat@yahoo.com

ABSTRAK

Pendahuluan: *Newcastle disease* (ND) merupakan salah satu penyakit infeksius paling penting dalam industri perunggasan, terutama unggas pedaging yaitu ayam broiler. Virus ND terdiri dari satu serotipe dan disebut juga sebagai avian paramyxovirus serotipe-1 (APMV-1). Infeksi virus ini menyebabkan kerugian ekonomi karena tingginya angka morbiditas dan mortalitas, penurunan produksi telur dan mahalnya biaya pengendalian dan pengontrolan penyakit. Salah satu strategi untuk menekan angka kerugian adalah dengan penentuan secara cepat dan tepat patotipe virus penyebab penyakit ND. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan patotipe virus ND secara cepat, tepat dan spesifik dengan metode RT-PCR dan REA pada virus ND yang diisolasi dari ayam broiler.

Metode: Sebanyak 4 isolat virus ND yang diambil dari ayam broiler digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Setelah dilakukan ekstraksi, RNA ekstrak digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi RT-PCR dengan sepasang primer spesifik, yaitu primer A dan primer B untuk mengamplifikasi gen penyandi protein Fusion (F) virus ND. Produk RT-PCR kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 1,5 % dengan pewarnaan *florosafe DNA stain*. *Restriction endonuclease analysis* (REA) dengan enzim endonuclease restriksi *Hin11* dilakukan untuk penentuan patotipe virus ND strain virulen atau avirulen didasarkan pada pola hasil pemotongan fragmen DNA yang dihasilkan. Visualisasi pemotongan DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarose pada konsentrasi 2,5 % dengan pewarnaan *florosafe DNA stain*. Produk amplifikasi disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida dan asam amino gen penyandi protein F. Hasil sekuensing DNA dianalisis dengan metode *neighbor joining* menggunakan software MEGA 6.1. Patotipe virus ND dapat diketahui dengan melihat keberadaan asam amino basa pada cleavage site.

Hasil: Hasil visualisasi produk RT-PCR terlihat fragmen DNA sebesar 363 bp pada keempat isolat virus ND yang digunakan. Hasil REA menunjukkan bahwa dua dari empat isolat tersebut mempunyai sekuen pengenalan untuk enzim *Hin11*, sehingga terlihat adanya dua fragmen DNA, sementara dua isolat yang lain tidak terpotong oleh enzim *Hin 11*. Berdasarkan hasil analisis REA yang dicocokkan dengan analisis hasil sekuensing DNA, sebanyak dua isolat termasuk kedalam virus ND patotipe avirulen (lentogenik) dan dua isolat lain sebagai virus ND patotipe virulen (mesogenik).

Simpulan: Teknik RT-PCR yang diikuti sekuensing dapat membedakan patotipe virus ND *velogenic*, *mesogenic* dan *lentogenic* secara spesifik serta dapat membedakan virus ND virulen dan avirulen secara cepat jika diikuti dengan teknik REA dengan enzim restriksi *Hin11*.

Kata kunci: *Newcastle disease*, Patotipe, Protein *fusion*, RT-PCR, REA.

PENDAHULUAN

Newcastle disease (ND) atau lebih sering dikenal sebagai penyakit tetelo merupakan penyakit respirasi dan bersifat sistemik yang sangat menular serta menimbulkan banyak kematian pada unggas berbagai umur.¹ Penyakit ND disebabkan oleh virus *Avian paramyxovirus* serotipe I (APMV-I) yang termasuk dalam genus *Avulavirus* dan famili *Paramixoviridae*, dan ordo *Mononegavirales*. Virus ND telah menyebar ke seluruh dunia dan menjadi salah satu masalah utama industri perunggasan.²

Strain virus ND dibedakan menjadi empat kelompok atau patotipe berdasarkan virulensinya yaitu *viscerotropic velogenic*, *neurotropic velogenic*, *mesogenic*, dan *lentogenic*.³ Pengetahuan mengenai patotipe virus ND penting untuk diketahui karena mempengaruhi mortalitas dan morbiditas.

Penyakit ND pada unggas banyak menyebabkan kerugian ekonomi karena memiliki mortalitas dan morbiditas yang tinggi, penurunan produksi telur serta besarnya biaya pengendalian.⁴ Pengendalian dan penanganan penyakit ND penting untuk dilakukan mengingat banyaknya kerugian yang ditimbulkan sehingga diagnosa yang tepat dan cepat diperlukan.⁵

Identifikasi virus ND dapat dilakukan dengan berbagai teknik pengujian baik secara konvensional maupun molekuler. Sebagian besar diagnosa laboratorik yang dilakukan saat ini memerlukan waktu relatif lama dan kondisi tertentu. Deteksi secara cepat dan tepat untuk menentukan keberadaan virus ND merupakan kunci utama dalam pengendalian penyakit. Sekuensing asam amino protein *fusion* (F) virus ND yang didahului *reverse transcription*

polymerase chain reaction (RT-PCR) dapat digunakan untuk membedakan patotipe virus ND secara cepat dan tepat dengan indikator keberadaan fenilalanin dan leusin pada *cleavage site*.⁴ Teknik *restriction endonuclease analysis* (REA) dapat digunakan untuk membedakan virus ND strain virulen dan avirulen melalui pemotongan DNA pada *restriction site* dengan enzim tertentu. Kombinasi antara RT-PCR dan REA dapat menjadi pilihan untuk identifikasi cepat patotipe virus ND.⁶

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan patotipe virus ND pada ayam broiler secara cepat dan spesifik menggunakan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang diikuti teknik *restriction endonuclease analysis* (REA) dengan enzim *Hin11*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang teknik identifikasi patotipe virus ND secara cepat dan mudah diaplikasikan.

METODE

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil isolasi RNA virus ND pada ayam broiler dari telur ayam berembrio *specific antibody negative* (TAB SAN) yang berasal dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates. Sebanyak 4 isolat yang digunakan dalam penelitian diberi kode BR1, BR2, BR3, dan BR4. Hasil isolasi RNA digunakan sebagai *template* amplifikasi gen penyandi protein *fusion* (F) virus ND dengan menggunakan sepasang primer spesifik, primer A dan primer B yang ditampilkan pada Tabel 1.⁷

Tabel 1. Primer gen penyandi protein F virus ND

Kode	Sense	Sekuen Primer	Produk PCR
A	+	5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3'	363 bp
B	-	5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3'	

Amplifikasi gen penyandi protein F virus ND dilakukan dengan Roche *Transcriptor One-Step RT-PCR Kit* (nomor katalog: 04 655 877 001) dimulai dari satu siklus *reverse transcription* pada suhu 50° C selama 30 menit dan *initial denaturation* pada suhu 94° C selama 7 menit. Proses amplifikasi PCR terdiri dari 40 siklus yang terbagi menjadi 3 tahapan yang dimulai dari tahap *denaturation* pada suhu 94°C selama 10 detik, dilanjutkan dengan tahapan *annealing* pada suhu 50° C selama 30 detik, dan tahap terakhir *extention* pada suhu 68° C selama 30 detik. Tahapan selanjutnya adalah *final extention* pada suhu 68° C selama 7 menit dan diakhiri dengan proses *soak* dengan suhu 4° C selama 3,5 detik. Produk hasil RT-PCR dipisahkan dengan proses elektroforesis kemudian divisualisasikan pada *gel agarose UltraPure™* Invitrogen (nomor Katalog: 16500-100) 1,5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan empat isolat virus *newcastle disease* (ND) pada ayam broiler yang berasal dari koleksi Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates periode 2012-2013 yang sudah melalui proses isolasi RNA dari suspensi virus ND pada telur ayam berembrio *specific antibody negative* (TAB SAN). Isolat RNA kemudian digunakan sebagai *template* pada amplifikasi gen F virus ND dengan metode RT-PCR. Produk hasil RT-PCR dipisahkan dengan proses elektroforesis kemudian divisualisasikan pada *gel agarose* 1,5%. Produk RT-PCR yang dihasilkan berukuran 363 bp ditampilkan pada Gambar 1.

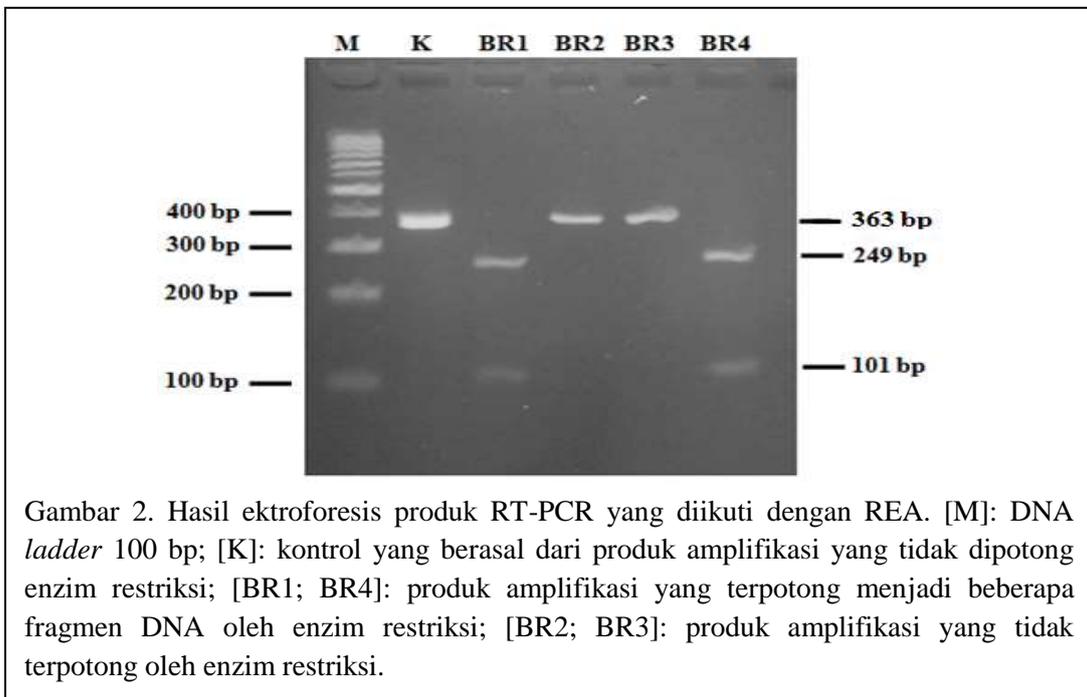
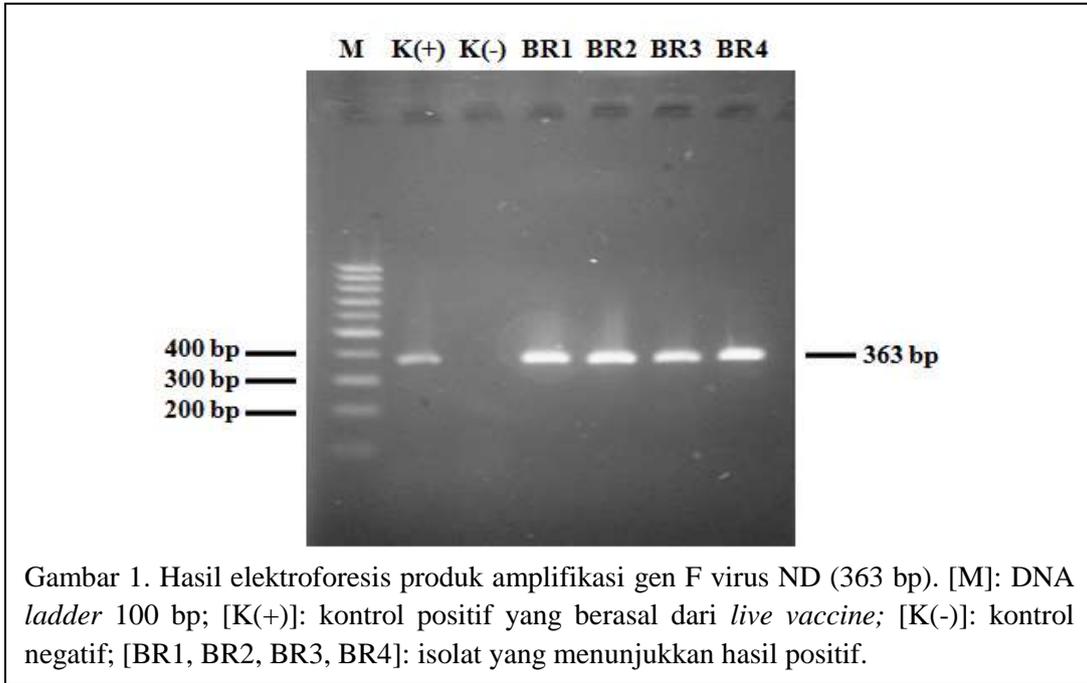
Penentuan urutan basa nukleotida dengan sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan

asam amino yang menentukan struktur protein dan fungsinya. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan program MEGA 6.06 dengan melakukan *multiple alignment neighbor joining* antara sekuen nukleotida isolat uji dan data gen penyandi protein F virus ND dari *Genbank*. Perbedaan asam amino pada *cleavage site* dan sekitarnya dapat digunakan sebagai acuan penentuan patotipe virus ND.⁹

Gen F menjadi target amplifikasi dalam penentuan patotipe virus ND karena memiliki peran penting dalam penentuan virulensi.¹⁰ Strain virus *velogenic* dan *mesogenic* termasuk dalam kelompok virulen dengan sekuen 112R/K-R-Q-K/R-R116 dengan fenilalanin pada *cleavage site*, sedangkan strain virus *lentogenic* termasuk dalam kelompok avirulen dengan sekuen 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 dan leusin pada *cleavage site*.^{1,9} Strain virus ND velogenik memiliki 2 pasang residu asam amino basa di sekitar *cleavage site*. Strain *mesogenic* memiliki dua pasang residu asam amino basa atau arginin tunggal dan sepasang lisin/arginin pada *critical position cleavage site*. Strain *lentogenic* virus ND hanya terdapat dua residu asam amino basa tunggal pada *critical position cleavage site*.^{4,9} Dengan melihat urutan sekuen asam amino dan *cleavage site* dapat ditentukan patotipe virus ND. Isolat BR1 dan BR4 mempunyai sekuen asam amino 112G-R-Q-G-R116 dan leusin pada *cleavage site* sehingga dikategorikan dalam strain virus ND avirulen/lentogenik. Hasil analisis sekuen asam amino menunjukkan kesesuaian dengan hasil penentuan patotipe virus ND metode REA dengan enzim *Hin11* yaitu keduanya menunjukkan dalam strain virus ND

lentogenik. Sampel uji BR2 dan BR3 mempunyai sekuen asam amino 112R-R-Q-K-R116 dan fenilalanin pada *cleavage site*

sehingga dikategorikan dalam strain virus ND virulen/mesogenik.



Empat produk amplifikasi positif ND dibedakan patotipenya dengan metode REA menggunakan enzim restriksi *Hin11* yang diperoleh dari bakteri *Haemophilus influenza* RFL1.⁶ Enzim ini mampu membedakan

patotipe virus ND berdasarkan pola pemotongan DNA yang dapat divisualisasikan dengan elektroforesis *gel agarose* 2,5%. Sekuen pengenalan enzim *Hin11* adalah 5'...G R ↓ C G Y C... 3' dan 3'...C Y G C ↑ R

G... 5' , yaitu R mewakili basa purin dan Y mewakili basa pirimidin. Berdasarkan sekuen pengenalan yang dihasilkan enzim *Hin11* dapat membedakan virus ND virulen dan avirulen. Virus ND virulen tidak memiliki sekuen pengenalan *Hin11* sehingga DNA virus ND tidak terpotong oleh enzim *Hin11* sedangkan virus ND avirulen memiliki sekuen pengenalan *Hin11* sehingga menunjukkan pola pemotongan tertentu pada elektroforesis gel agarose setelah diinkubasi selama 3 jam. Visualisasi hasil elektroforesis produk RT-PCR yang diikuti dengan REA ditampilkan dalam Gambar 2.

Gambar 2, terpisahnya DNA menjadi beberapa fragmen pada sampel uji BR1 dan BR4 menunjukkan adanya sekuen pengenalan yang menjadi tempat menempelnya enzim restriksi dan melakukan pemotongan pada sekuen tersebut. Jumlah fragmen yang dihasilkan dipengaruhi oleh panjang sekuen pengenalan.⁸ Enzim *Hin11* yang mempunyai sekuen pengenalan sepanjang 6 pasang basa memotong untai DNA BR1 dan BR4 pada 2 tempat yaitu pada nukleotida ke 249 dan

nukleotida ke 262 sehingga menghasilkan 3 pola pemotongan DNA pada elektroforesis gel agarose 2,5% yaitu 249 bp, 101 bp, dan 13 bp. Visualisasi elektroforesis gel agarose 2,5% BR1 dan BR2 menunjukkan DNA terpisah menjadi 2 fragmen yaitu pada 249 bp dan 101 bp sedangkan fragmen 13 bp tidak tervisualisasi karena ukurannya terlalu kecil. Dengan demikian berdasarkan pola pemotongan fragmen yang terbentuk, isolat uji BR1 dan BR4 digolongkan sebagai strain virus ND avirulen. Produk amplifikasi BR2 dan BR3 tidak menunjukkan terjadinya restriksi DNA dibuktikan dengan fragmen DNA yang tetap utuh selain itu sampel tetap sejajar dengan kontrol *uncutting*. Ketiadaan sekuen pengenalan pada BR2 dan BR3 menunjukkan bahwa kedua isolat uji tersebut tergolong dalam strain virus ND virulen. Analisis dengan *CLC sequence viewer 7.0.2* untuk melihat sekuen pengenalan enzim *Hin11* pada isolat uji. Rekapitulasi hasil penentuan patotipe virus ND dengan teknik RT-PCR dan REA tampak pada Tabel 2.

Tabel 2. Rekapitulasi hasil penentuan patotipe virus ND dengan teknik RT-PCR dan REA

Kode isolat	<i>Hin11</i> (bp)	RT-PCR (asam amino 112-117)	Strain
BR1	13/101/249	G R Q G R L	Avirulen/ <i>lentogenic</i>
BR2	363	R R Q K R F	Virulen/ <i>mesogenic</i>
BR3	363	R R Q K R F	Virulen/ <i>mesogenic</i>
BR4	13/101/249	G R Q G R L	Avirulen/ <i>lentogenic</i>

SIMPULAN

Teknik RT-PCR yang diikuti sekuensing dapat membedakan patotipe virus ND *velogenic*, *mesogenic* dan *lentogenic* secara spesifik serta dapat membedakan virus ND virulen dan avirulen secara cepat jika diikuti dengan teknik REA dengan enzim restriksi *Hin11*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates di Yogyakarta dan Kepala Bagian Biokimia, Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada (FKH-UGM) atas ijin penggunaan fasilitas laboratoriumnya. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UGM, Yogyakarta. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Hibah

Kompetensi Tahun Anggaran 2014-2015
DP2M DIKTI Kemendiknas Republik
Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alexander DJ. *Newcastle Disease and Other Paramyxovirus Infections*. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, eds. *Diseases of Poultry*, 9th ed. Ames: Iowa State University Press; 1991: 496-519.
2. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's Veterinary Virology*, 4th ed. London: Academic Press; 2011: 301-13.
3. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. London: Blackwell Science; 2002: 305-89.
4. Alexander DJ. Newcastle Disease and Other Paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2000; 19(2): 443-62.
5. Tabbu CR. *Penyakit Ayam dan Penanggulangan*. Yogyakarta: Kanisius; 2000: 164.
6. Mase M, Kanehira K. Differentiation of APMV-1 by PCR and REA. *J Vet Med Sci.* 2012: 1-10.
7. Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, Balk F, Terhurne A. Differentiation of Virulent and Non-Virulent strains of Newcastle Disease Virus within 24 Hours by Polymerase Chain Reaction. *Avian Pathol.* 1997; 26: 837-949.
8. Wilson K, Walker J. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
9. Collins MS, Strong I, Alexander DJ. Pathogenicity and Phylogenetic Evaluation of The Variant Newcastle Disease Viruses Termed "Pigeon PMV-1 Viruses" Based on The Nucleotide Sequence of The Fusion Protein Gene. *Arch Virol.* 1996; 141: 635-47.
10. Oberdorfer A, Warner O. Newcastle Disease Virus: Detection and Characterization by PCR of Recent German Isolates Differing in Pathogenicity. *Avian Pathol.* 1998; 27: 237-243.

PERAN ENZIM p38 *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) TERHADAP PENINGKATAN KADAR ANGIOTENSINOGEN PADA KULTUR ADIPOSIT YANG TERPAJAN GLUKOSA TINGGI

Novi Khila Firani¹, M Rasjad Indra²

¹Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, ²Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

E-mail: novikhila@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperglikemia telah diketahui dapat meningkatkan produksi angiotensinogen oleh adiposit. Pada sel tubular ginjal, peningkatan angiotensinogen pada kondisi glukosa tinggi melibatkan aktifitas enzim p38 MAPK, tetapi di adiposit belum diketahui.

Metode: Adiposit yang diisolasi dari jaringan adiposa visceral tikus *Rattus norvegicus strain Wistar* jantan dikultur dalam medium yang mengandung glukosa dengan konsentrasi sebesar 5 mM, 11mM dan 25mM selama 24 jam. Kadar angiotensinogen dan p38 MAPK yang terfosforilasi dianalisis menggunakan metode ELISA. Analisa data menggunakan *one-way* ANOVA dilanjutkan dengan uji *Tukey* dan analisis *Path*.

Hasil: Kadar angiotensinogen dalam kultur adiposit dengan pajanan glukosa 25mM lebih tinggi dibandingkan kadar angiotensinogen kultur dengan pajanan glukosa 5mM ($p=0,000$) dan 11mM ($p=0,002$). Kadar enzim p38 MAPK yang terfosforilasi pada kultur adiposit dengan pajanan glukosa 25 mM dan 11 mM lebih tinggi dibandingkan yang terdapat pada kultur dengan pajanan glukosa 5 mM ($p=0,000$). Hasil analisis *Path* menunjukkan ada pengaruh p38 MAPK ($r=0,581$; $p=0,003$) terhadap peningkatan angiotensinogen pada adiposit yang dipajan glukosa tinggi.

Kesimpulan: Pajanan glukosa tinggi meningkatkan kadar angiotensinogen dan enzim p38 MAPK yang terfosforilasi di kultur adiposit. Peningkatan angiotensinogen diduga melalui jalur yang melibatkan aktifitas enzim p38 MAPK.

Kata Kunci: kultur, adiposit, glukosa, angiotensinogen, p38 MAPK

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan salah satu faktor resiko hipertensi. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kenaikan berat badan sebesar 10 kilogram berkorelasi dengan peningkatan tekanan darah sistolik sebesar 3,0 mmHg dan tekanan darah diastolik sebesar 2,3 mmHg.¹ Distribusi jaringan adiposa pada obesitas berimplikasi pada resiko timbulnya

penyakit. Berdasarkan hasil penelitian membuktikan ada hubungan antara obesitas abdominal dengan terjadinya penyakit kardiovaskuler, salah satunya adalah hipertensi.^{2,3,4} Mekanisme yang menerangkan hubungan obesitas abdominal dengan kejadian penyakit kardiovaskuler masih belum jelas. Jaringan adiposa intraabdominal diduga lebih aktif dalam memproduksi berbagai molekul

yang berperan dalam metabolisme dibandingkan jaringan adiposa di bagian lain dalam tubuh.⁴

Ada beberapa mekanisme yang menerangkan terjadinya hipertensi pada obesitas, salah satunya adalah melalui aktivasi sistem renin angiotensin (RAS). Penelitian sebelumnya pada tikus yang diberi diet tinggi lemak untuk menginduksi terjadinya obesitas memperlihatkan terjadinya peningkatan tekanan darah yang disebabkan oleh peningkatan aktivasi RAS.⁵ Penelitian lain pada tikus transgenik yang meng-*overekspresi* angiotensinogen hanya di jaringan adiposa menunjukkan peningkatan angiotensinogen plasma dan terjadi peningkatan tekanan darah.⁶ Hal ini menunjukkan adanya peran angiotensinogen dari jaringan adiposa dalam regulasi tekanan darah.

Adiposit telah diketahui dapat memproduksi angiotensinogen serta beberapa komponen lainnya yang berperan dalam RAS, selain hati sebagai organ primer penghasil angiotensinogen.⁷ Angiotensinogen merupakan prekursor untuk membentuk angiotensin II, yang merupakan efektor utama yang memediasi terjadinya hipertensi.⁸ Hiperglikemia diketahui merupakan salah satu faktor yang dapat memodulasi ekspresi gen angiotensinogen di jaringan adiposa.⁹ Namun bagaimana mekanisme yang menjelaskan peningkatan angiotensinogen pada adiposit akibat kondisi glukosa tinggi masih belum jelas. Berdasarkan penelitian Hsieh *et al.*, (2002) pada kultur sel tubular ginjal memperlihatkan bahwa peningkatan ekspresi angiotensinogen akibat pajanan glukosa tinggi melibatkan aktifitas enzim p38 *mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK).¹⁰ Jalur aktivasi p38 MAPK terutama melalui *apoptosis signal-regulating kinase* (ASK1), merupakan sensor stress oksidatif yang diaktifkan oleh *reactive oxygen species* (ROS).¹¹ Belum diketahui apakah peningkatan angiotensinogen

di adiposit akibat pajanan glukosa tinggi juga melibatkan aktifitas enzim p38 MAPK.

METODE PENELITIAN

Kultur Adiposit

Kultur adiposit berasal dari hasil isolasi preadiposit dari jaringan adiposa visceral tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan berusia 2-3 minggu. Jaringan serat (fibrosa) dan pembuluh darah terlebih dahulu dibuang, kemudian jaringan adiposa dicuci dengan 10 mL larutan *phosphate buffer saline* (PBS), selanjutnya dicacah. Suspensi jaringan tersebut diinkubasi dengan 0,2% *Collagenase* jenis I selama 45 menit, suhu 37°C dengan pengocokan. Inkubasi dihentikan dengan menambahkan media perbenihan *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) yang ditambahkan dengan 15 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid *buffer solution* (HEPES), 14 mmol/L NaHCO₃, 33 µmol/L biotin, 17 µmol/L *D-pantothenate* dan 10% *fetal bovine serum* (FBS). Suspensi sel diputar 1500 rpm selama 7 menit, sehingga didapatkan pelet yang mengandung *fibroblast-like preadipocyte*. Selanjutnya sel diresuspensi dengan media perbenihan, kemudian diputar 1500 rpm selama 7 menit. Pelet diresuspensi lagi dengan media perbenihan. Suspensi sel ditumbuhkan di *culture plate* dengan inkubasi pada suhu 37 °C, 5% CO₂ selama 24 jam. Sel dicuci setiap 3 hari sekali. Setelah mencapai *monolayer*, preadiposit ditumbuhkan dalam media adipogenik, yaitu DMEM/F12 dengan ditambahkan 100 U/mL penisilin dan 100 U/mL streptomisin, serta 66 nM insulin, 100 nM deksametason, 0,5 mM *isobutylmethylxanthine* (IBMX) dan 10 µg/mL transferin, untuk menstimulasi diferensiasi preadiposit menjadi adiposit yang dewasa.¹²

Pajanan glukosa

Kultur preadiposit diinduksi differensiasinya selama 24 jam menjadi adiposit yang matur,¹² kemudian pada medium kultur dipajankan glukosa dengan konsentrasi 5 mM sebagai kondisi fisiologis yang bertugas sebagai pengendali normal, serta konsentrasi glukosa 11 mM dan 25 mM sebagai kondisi glukosa tinggi.¹³ Sel diinkubasi selama 24 jam kemudian dilakukan pengukuran parameter penelitian.

Pemeriksaan Morfologi Adiposit dengan Pengecatan Oil Red O

Pengamatan morfologi adiposit dilakukan dengan metode pengecatan menggunakan *Oil Red O*. Sel pada masing-masing perlakuan difiksasi dengan formalin 10%. Sel dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan. Selanjutnya sel ditetesi dengan *propylene glycol* 2 kali, selama masing-masing 5 menit, kemudian ditetesi dengan pewarna *Oil Red O* selama 7 menit. Sel dicuci dengan akuades kemudian ditetesi *hematoxylin* selama 1 menit. Sel dicuci lagi dengan akuades dan ditunggu sampai kering, setelah itu diamati dengan mikroskop cahaya *Olympus* pada perbesaran 400x.¹⁴

Pengukuran Kadar Enzim p38 MAPK Intrasel Adiposit dengan metode ELISA

Sel adiposit dilisiskan terlebih dahulu dengan *lysis buffer* (mengandung 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% *glycerol*, 50 mM dithiothreitol, dan 0.1% *bromophenol blue*). Kemudian dilakukan pengukuran p38MAPK terfosforilasi dengan ELISA berdasarkan prosedur yang tertera dalam *p38 immunoassay kit assay*.¹⁵

Pengukuran kadar angiotensinogen dengan metode ELISA

Antigen (kadar antigen 1 µg/ml) dalam *coating buffer* (1: 9) didapatkan dengan

melarutkan dalam TBS sampai 1 ml hingga memiliki kadar 10 µg/ml dan ditambahkan *coating buffer* hingga 10 ml. Antigen di-*coating* pada *plate* ELISA selama semalam pada suhu 4°C. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. Diblok dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PBS) 50 µl / *well*. Diinkubasi selama 2 jam suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. *Coating* antibodi primer (50 µl / *well*) dengan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. *Coating* antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG AP Conjugated* (1:2500) dalam TBS melalui inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. Ditambahkan substrat pNPP dalam dietanolamin 10% (50 µl / *well*). Diinkubasi 30 menit, suhu ruang (tidak dicuci, yang dibaca adalah pNPP yang terikat Ab sekunder). Ditambahkan NaOH 3M (50 µl / *well*) sebagai *stop reaction*. Setelah 15 menit, dibaca dengan ELISA *reader* pada $\lambda=405$ nm.¹⁶

Analisis Statistik

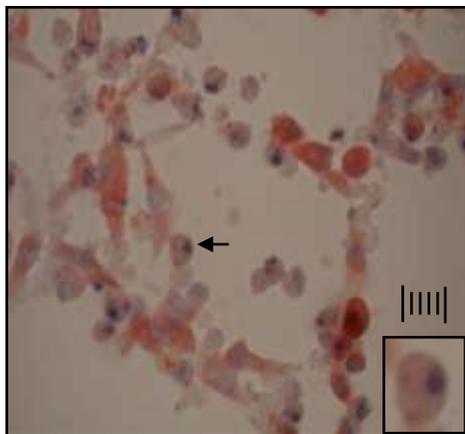
Data dianalisis sebagai data kelompok dan disajikan dalam bentuk rerata dan simpangan baku [rerata (SD)]. Data diuji dengan uji analisis ragam (ANOVA) untuk membandingkan perbedaan rerata tiap kelompok serta dilakukan analisis *Path* untuk mengetahui pengaruh pajanan glukosa tinggi terhadap kadar angiotensinogen dan p38 MAPK, dengan nilai $p<0,05$ dapat dianggap bermakna.

HASIL PENELITIAN

Morfologi Kultur Adiposit

Pengamatan morfologi adiposit menggunakan pengecatan *Oil red O* untuk mendeteksi adanya tetes lemak (*lipid droplet*), karena secara fisiologis adiposit berperan sebagai tempat menyimpan cadangan energi berupa triasilgliserol yang nampak sebagai

tetes lemak yang berwarna merah. Sebagai *counterstain* digunakan *hematoxylin* untuk mewarnai bagian sel lainnya yang nampak berwarna biru (Gambar 1). Pada Gambar 1 membuktikan bahwa sel yang diamati adalah adiposit. Gambaran ini sesuai dengan karakteristik adiposit yang matur menurut Junqueira,¹⁷ yang menyebutkan bahwa adiposit matur memiliki bentuk sel bulat dengan tetesan lemak yang sangat besar, sehingga menempatkan inti sel dan sitoplasma pada bagian tepi sel.



Gambar 1 : Morfologi perbenihan adiposit dengan pengecatan *Oil red O* yang diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Kadar Enzim p38 MAPK Terfosforilasi pada Kultur Adiposit

Hasil pengukuran kadar p38 MAPK terfosforilasi pada kultur adiposit yang dipajan glukosa konsentrasi 5 mM, 11 mM dan 25 mM dengan menggunakan metode ELISA disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Kadar p38 MAPK terfosforilasi

Kelompok pajanan glukosa pada kultur Adiposit	Rerata (SD) Kadar p38 MAPK (pg/mL)
Glukosa 5 mM	209 (32,51)
Glukosa 11 mM	676,5 (122,09)
Glukosa 25 mM	694 (130,71)

Berdasarkan hasil mengukur didapatkan perbedaan yang bermakna antara rerata kadar p38 MAPK terfosforilasi di kultur adiposit yang dipajan glukosa 25 mM dan 11 mM dibandingkan yang terdapat pada pajanan glukosa 5 mM ($p=0,000$). Kadar p38 MAPK yang terfosforilasi pada pajanan glukosa 25 mM tidak berbeda bermakna dengan kadar p38 MAPK pada kelompok pajanan glukosa 11 mM ($p=0,941$).

Kadar Angiotensinogen pada Kultur Adiposit

Hasil pengukuran kadar angiotensinogen pada kultur adiposit yang dipajan glukosa konsentrasi 5 mM, 11 mM dan 25 mM dengan menggunakan metode ELISA disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Kadar Angiotensinogen

Kelompok pajanan glukosa pada kultur Adiposit	Rerata (SD) Kadar Angiotensinogen (pg/mL)
Glukosa 5 mM	54,94 (9,52)
Glukosa 11 mM	64,59 (17,92)
Glukosa 25 mM	88,16 (4,29)

Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan perbedaan yang bermakna antara rerata kadar angiotensinogen di kultur adiposit yang dipajan glukosa 25 mM dibandingkan yang terdapat pada pajanan glukosa 5 mM ($p=0,000$) dan pada pajanan glukosa 11 mM ($p=0,002$). Kadar angiotensinogen pada pajanan glukosa 11 mM tidak berbeda nyata dengan kadar angiotensinogen pada pajanan glukosa 5 mM ($p=0,263$).

Analisis Path

Hubungan antara masing-masing variabel dan seberapa besar pengaruh pajanan glukosa terhadap masing-masing variabel diuji dengan regresi korelasi dengan analisis *Path* yang

dinyatakan dalam koefisien Path (r) dan nilai signifikansinya dinyatakan sebagai p . Berdasarkan analisis *Path* diketahui bahwa ada pengaruh pajanan glukosa kepada enzim p38 MAPK di kultur adiposit ($r=0,808$; $p=0,000$), dan ada pengaruh pajanan glukosa terhadap peningkatan kadar angiotensinogen ($r=0,758$; $p=0,000$). Terdapat pengaruh enzim p38 MAPK terhadap kadar angiotensinogen ($r=0.581$; $p= 0.003$).

PEMBAHASAN

Enzim p38 MAPK merupakan salah satu anggota famili MAP serin/threonin protein kinase, selain *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK1 atau p44MAPK), ERK2 (p42MAPK), dan c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) atau *stress-activated protein kinase* (SAPK).^{11,18} Aktifasi p38 MAPK diinduksi oleh berbagai stimulus stress endogen maupun eksogen, antara lain hiperglikemia, ROS, stress osmotik, sitokin-sitokin proinflamasi, *heat shock* dan radiasi sinar ultra violet. Diantara beberapa stimulator aktifasi p38 MAPK tersebut, ROS yang sangat kuat dalam mengaktifasi p38 MAPK.^{11,19} Penelitian pada sel tubular ginjal dilaporkan bahwa pajanan glukosa tinggi dapat meningkatkan produksi ROS dan mengaktifasi p38 MAPK.¹⁰ Pada penelitian ini terbukti bahwa pajanan glukosa tinggi pada kultur adiposit, yaitu pada konsentrasi glukosa 11 mM dan 25 mM dapat meningkatkan aktifitas enzim p38 MAPK, melalui peningkatan kadar enzim p38 MAPK yang terfosforilasi.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pajanan glukosa 11 mM sudah menimbulkan efek pada peningkatan aktifitas enzim p38 MAPK yang tidak berbeda dengan yang terdapat pada pajanan glukosa 25 mM. Peningkatan aktifitas enzim p38 MAPK pada pajanan glukosa 11 mM dan 25 mM diduga akibat peningkatan ROS. Menurut Evans *et al.*, (2002), ROS dapat mengaktifkan ASK1 yang

merupakan sensor adanya stress oksidatif. ASK1 mengaktifkan MKK3/6 (MAPK kinase) yang selanjutnya memfosforilasi enzim p38 MAPK pada residu threonin180 dan tirosin182 sehingga enzim p38 MAPK menjadi aktif. Enzim p38 MAPK yang teraktifasi selanjutnya dapat memfosforilasi *actifator transcription factors* (ATF-2) yang menstimulasi transkripsi gen. Enzim p38 MAPK yang aktif dapat mempengaruhi beberapa proses seluler, antara lain pertumbuhan sel dan apoptosis, inflamasi, serta respon jaringan spesifik akibat stres melalui regulasi ekspresi gen. Enzim p38 MAPK juga meregulasi serin kinase dan mengaktifasi faktor transkripsi yang menyebabkan berbagai efek patologis.¹¹

Hasil penelitian ini juga diketahui bahwa pada pajanan glukosa yang tinggi (konsentrasi 25 mM), terjadi peningkatan sekresi angiotensinogen yang bermakna dibandingkan dengan sekresi angiotensinogen pada kultur adiposit yang dipajan glukosa 5 mM dan 11 mM. Angiotensinogen adalah molekul glikoprotein dengan berat molekul sekitar 55-60 kilodalton. Angiotensinogen merupakan prekursor angiotensin II dalam RAS dan sebagai substrat bagi enzim renin.²⁰ Studi regulasi ekspresi angiotensinogen di hepar diketahui bahwa angiotensinogen termasuk dalam protein fase akut kelas I yang ekspresinya diregulasi oleh *interleukin* (IL)-1 α dan β serta *tumor necrosis factor* (TNF) α dan β . Penelitian di sel hepatosit diketahui bahwa ekspresi angiotensinogen juga dipengaruhi oleh IL-6 yang merupakan aktivator ekspresi protein fase akut kelas II. Angiotensinogen tidak hanya diekspresikan oleh hepar, melainkan juga diekspresikan oleh beberapa jaringan seperti otak, jantung, ginjal dan jaringan adiposa, yang mana ekspresinya dapat mempengaruhi fungsi organ secara lokal. Hasil penelitian diketahui bahwa sistem renin angiotensin dapat berfungsi secara lokal, bergantung pada masing-masing organ/jaringan, sehingga memunculkan konsep

“local” atau “tissue” renin angiotensin systems.²² Di jaringan adiposa, sistem RAS berperan dalam pertumbuhan jaringan adiposa, selain itu juga diketahui berperan dalam patogenesis hipertensi yang berhubungan dengan obesitas.²³ Penelitian oleh Gabriely (2001) pada tikus yang diberi pajanan glukosa tinggi hingga 18 mM menyebabkan peningkatan ekspresi gen angiotensinogen di jaringan adiposa.⁹ Hasil penelitian ini terbukti bahwa pajanan glukosa tinggi, yakni pada kadar glukosa 25 mM dapat meningkatkan sekresi angiotensinogen oleh adiposit.

Mekanisme peningkatan kadar angiotensinogen di kultur adiposit pada pajanan glukosa tinggi (25 mM) diduga melalui jalur biokimia yang diaktifkan akibat peningkatan ROS, yang selanjutnya dapat mengaktifkan enzim p38 MAPK.¹¹ Penelitian pada sel tubular ginjal dilaporkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi mRNA angiotensinogen yang disebabkan oleh peningkatan pembentukan ROS. ROS akan mengaktifkan enzim p38 MAPK yang kemudian mengaktifkan faktor transkripsi yang berperan pada ekspresi gen angiotensinogen.¹⁰ Berdasarkan analisis *Path* dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh enzim p38 MAPK terhadap kadar angiotensinogen ($r=0.581$; $p=0.003$), namun dugaan ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa pajanan glukosa tinggi (25 mM) selama 24 jam dapat meningkatkan sekresi angiotensinogen oleh adiposit dan kadar enzim p38 MAPK yang terfosforilasi. Peningkatan kadar angiotensinogen pada kultur adiposit yang dipajan glukosa tinggi tersebut diduga melalui mekanisme akibat peningkatan produksi ROS yang mengaktifkan enzim p38 MAPK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini disampaikan ucapan terima kasih kepada Dekan FKUB dan Ketua Unit pengembangan penelitian FKUB atas didanainya penelitian ini, serta kepada semua pihak, khususnya kru laboratorium fisiologi molekuler, yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brown CD, Higgins M, Donato KA, Rohde FC, Garrison R, Obarzanek E, Ernst ND, and Horan M. Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. *Obes Res.* 2000; 8: 605–619.
2. Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Postano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, and Ferrannini E. Visceral Fat in Hypertension Influence on Insulin Resistance and β -Cell Function. *Hypertension.* 2004;44(2):127-133.
3. Grundy SM. Metabolic Syndrome: Connecting and Reconciling Cardiovascular and Diabetes Worlds. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;47:1093–100.
4. Flier JS. Obesity, In Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, Mc Graw Hill company. 2001.
5. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL. Development of a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2000;35:1009–1015.
6. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000;35: 1270-1277.
7. Kershaw E, and Flier J. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–2556.
8. Vikrant S, and Tiwari SC. Essential Hypertension–Pathogenesis and Pathophysiology. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine.* 2001;2(3): 140-162.
9. Gabriely I, Xiao MY, and Cases JA. Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am Jphysiol Integrative Comp.Physiol.* 2001;281: R795-R802.
10. Hsieh T, Zhang S, Filep J, Tang S, Ingelfinger JR, and Chan J. High Glucose Stimulates Angiotensinogen Gene Expression via Reactive Oxygen Species Generation in Rat Kidney

- Proximal Tubular Cells. *Endocrinology*. 2002; 143(8):2975–2985.
11. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, and Grodsky GM. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002; 23(5):599–622.
 12. Indra MR, Satuman, and Widodo E. Optimalisasi proliferasi dan diferensiasi sel adiposit tikus. *Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Unibraw*. 2005.
 13. Wu X, Zhu L, Zilbering A, Mahadev K, Motoshima H, Yao J, and Goldstein BJ. Hyperglycemia Potentiates H₂O₂ Production in Adipocytes and Enhances Insulin Signal Transduction: Potential Role for Oxidative Inhibition of Thiol-Sensitive Protein-Tyrosine Phosphatases. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(5-6): 526–537.
 14. Gregoire F, Smas CM, and Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*. 1998;78 (3): 783-809.
 15. RayBio® Cell-Based Human/Mouse/Rat MAPK (Thr180/Tyr182) Phosphorylation ELISA Kit. 2009.
 16. Aubert JJ, Safnova R, Negre, and Ailhaud G. Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250: 77-82.
 17. Junqueira LC, and Carneiro J. *Basic Histology, text and atlas*, 11th ed. Singapore: McGraw-Hill; 2005.
 18. Thannickal VJ, and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1005-1028.
 19. Droge W. 2002, *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. *Physiol Rev*. 82: 47–95.
 20. Lynch KR, and Peach MJ. Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension*. 1991;17:263-269.
 21. Sherman CT, and Brasier AR. Role of Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and -3 in Inducible Regulation of The Human Angiotensinogen Gene by Interleukin-6. *Molecular Endocrinology*. 2001;15(3): 441-457.
 22. Klett C, Hellmann W, Hackenthal E, and Ganten D. Modulation of tissue angiotensinogen gene expression by glucocorticoids, estrogens, and androgens in SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens*. 1993;15:683-708.
 23. Serazin V, Dieudonné M, Morot M, Mazancourt P, and Giudicelli Y. cAMP-positive regulation of angiotensinogen gene expression and protein secretion in rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286: E434-E438.

DASAR MOLEKULER DAN MANIFESTASI KLINIS PASIEN AKONDROPLASIA DI INDONESIA

Dewi Megawati^{1,2}, Nanis S. Marzuki^{1,3}, Ita M. Nainggolan^{1,3}, Maria Swastika¹, Sintia Puspitasari¹, Iswari Setianingsih¹

¹Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, ²Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Warmadewa, Bali, ³Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Jakarta.

E-mail: dewimegawati.aa@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Akondroplasia merupakan kelainan pertumbuhan tulang yang diturunkan secara autosomal dominan. Sekitar 95% kasus akondroplasia disebabkan oleh mutasi pada gen pengatur pertumbuhan tulang yaitu mutasi substitusi G1138A pada gen *FGFR3*. Pada kondisi heterozigot penderita akondroplasia menunjukkan tampilan fisik habitus dan memiliki resiko tinggi mengalami kematian akibat penekanan saraf servikal dan obstruksi saluran nafas. Sedangkan, pada kondisi homosigot bersifat letal. Studi ini bertujuan untuk mengetahui presentase kasus yang memiliki tampilan klinis akondroplasia terkonfirmasi dengan teknik biologi molekuler melalui deteksi mutasi penyebab akondroplasia.

Metode: Metode deteksi mutasi yang digunakan yaitu PCR-RFLP dengan enzim restriksi *SfcI* dan *MspI*. Terdapat 22 kasus akondroplasia yang dirujuk ke Klinik GenNeka Lembaga Eijkman pada periode tahun 2006-2014 dengan manifestasi klinis *short stature*, *rhizomelik*, *frontal bossing* dan *lordosis*.

Hasil: Hasil deteksi mutasi menunjukkan 13 dari 22 orang pasien memiliki mutasi substitusi G1138A, dan tidak ditemukan mutasi G1138C. Kedua jenis mutasi tersebut menyebabkan substitusi asam amino ke-360 dari glisin menjadi arginin (G380R) yang terletak pada domain transmembran protein *FGFR3*. Berdasarkan data ini diketahui bahwa mutasi G1138A merupakan jenis mutasi tersering penyebab akondroplasia di Indonesia, namun tidak mencapai 95%. Hal ini menunjukkan kemungkinan spektrum mutasi yang melatarbelakangi akondroplasia di Indonesia lebih beragam.

Simpulan: Deteksi lebih lanjut menggunakan teknik sekuensing sebaiknya dilakukan untuk mendeteksi mutasi jenis lain penyebab akondroplasia pada gen *FGFR3* terutama untuk pasien yang ingin melakukan konseling genetik.

Kata kunci: akondroplasia, skeletal displasia, gen *FGFR3*, PCR-RFLP

PENDAHULUAN

Akondroplasia (ACH; OMIM: 100800) merupakan salah satu jenis displasia skeletal atau kelainan pertumbuhan tulang. Akondroplasia merupakan penyebab utama dwarfisme, dengan estimasi prevalensi 1 dari

10.000 dan 1 dari 30.000 kelahiran.¹ Akondroplasia termasuk kelainan genetik yang diturunkan secara autosomal dominan. Individu dengan akondroplasia heterozigot ditandai dengan lengan pendek, makrosefali, *depressed nasal bridge*, *frontal bossing*,

trident shaped-hand dan stenosis spinal. Individu dengan jenis mutasi heterozigot bersifat fertil dan akondroplasia dapat diturunkan pada keturunannya dengan sifat *complete penetrance*.² Akondroplasia homozigot diperkirakan bersifat letal. Sebagian besar kasus akondroplasia (lebih dari 80%) merupakan kelainan yang bersifat *de novo* atau sporadik yang sering dikaitkan dengan *late paternal age*.³

Akondroplasia disebabkan oleh mutasi pada gen *fibroblast growth factor receptor-3* (FGFR3) yang terletak pada lengan pendek kromosom 4 (4p16.3). Gen FGFR3 mengkodekan protein FGFR3 yang berperan sebagai reseptor pada jalur sinyal yang menghambat proliferasi dan meningkatkan differensiasi kondrosit.⁴ Protein FGFR3 terdiri dari 3 region yaitu: region ekstraseluler, transmembran, dan intraselular. Jenis mutasi pada gen FGFR3 yang paling umum melatarbelakangi akondroplasia adalah substitusi basa guanin menjadi adenin pada basa ke 1138 (G1138A) atau substitusi guanin menjadi sitosin (G1138C). Mutasi G1138A dilaporkan sebagai penyebab dari sebagian besar kasus akondroplasia (sekitar 90%) pada berbagai etnik.³ Kedua jenis mutasi tersebut menyebabkan substitusi asam amino ke-360 dari glisin menjadi arginin (G380R) yang terletak pada domain transmembran protein FGFR3.⁵ Residu glisin yang memiliki berat molekul kecil dan tidak bermuatan digantikan oleh residu arginin yang molekulnya besar dan bersifat basa menyebabkan terbentuknya ikatan hidrogen yang menstabilkan dimer FGFR3 sehingga FGFR3 teraktivasi tanpa adanya ligan yang berikatan (*constitutively activated*).⁶

Selain akondroplasia, displasia skeletal lain yang diakibatkan oleh mutasi pada gen FGFR3 adalah tanatophorik displasia (TD), hipokondroplasia (HPC), dan SADDAN

(*skeletal skin brain with acantosis nigricans*).⁷ Keempat jenis displasia skeletal tersebut memiliki tampilan fisik utama *short stature* namun dengan severitas yang berbeda tergantung pada letak mutasi pada gen FGFR3 dan perubahan asam amino yang diakibatkan oleh mutasi tersebut.⁴ Oleh karena itu, diperlukan suatu metode diagnostik untuk mengkonfirmasi ciri-ciri fisik yang tampak. Mengingat kelainan tersebut bersifat autosomal dominan dan *complete penetrance* serta dalam bentuk homozigot bersifat letal, teknik biomolekuler merupakan salah satu teknik yang akurat untuk mendiagnosis displasia skeletal. Pendeteksian mutasi penyebab akondroplasia difokuskan pada mutasi G1138A dan G1138C yang umumnya melatarbelakangi akondroplasia pada seluruh etnik. Studi ini bertujuan untuk mengetahui presentase kasus yang memiliki tampilan klinis akondroplasia terkonfirmasi dengan teknik biologi molekuler melalui deteksi mutasi penyebab akondroplasia. Berdasarkan data yang diperoleh diharapkan dapat ditentukan apakah pendeteksian mutasi jenis lain pada gen FGFR3 diperlukan selain kedua jenis mutasi tersebut diatas untuk kasus akondroplasia di Indonesia. Pendeteksian jenis mutasi merupakan hal yang sangat penting terutama bagi pasien yang ingin melakukan konseling genetik.

METODE

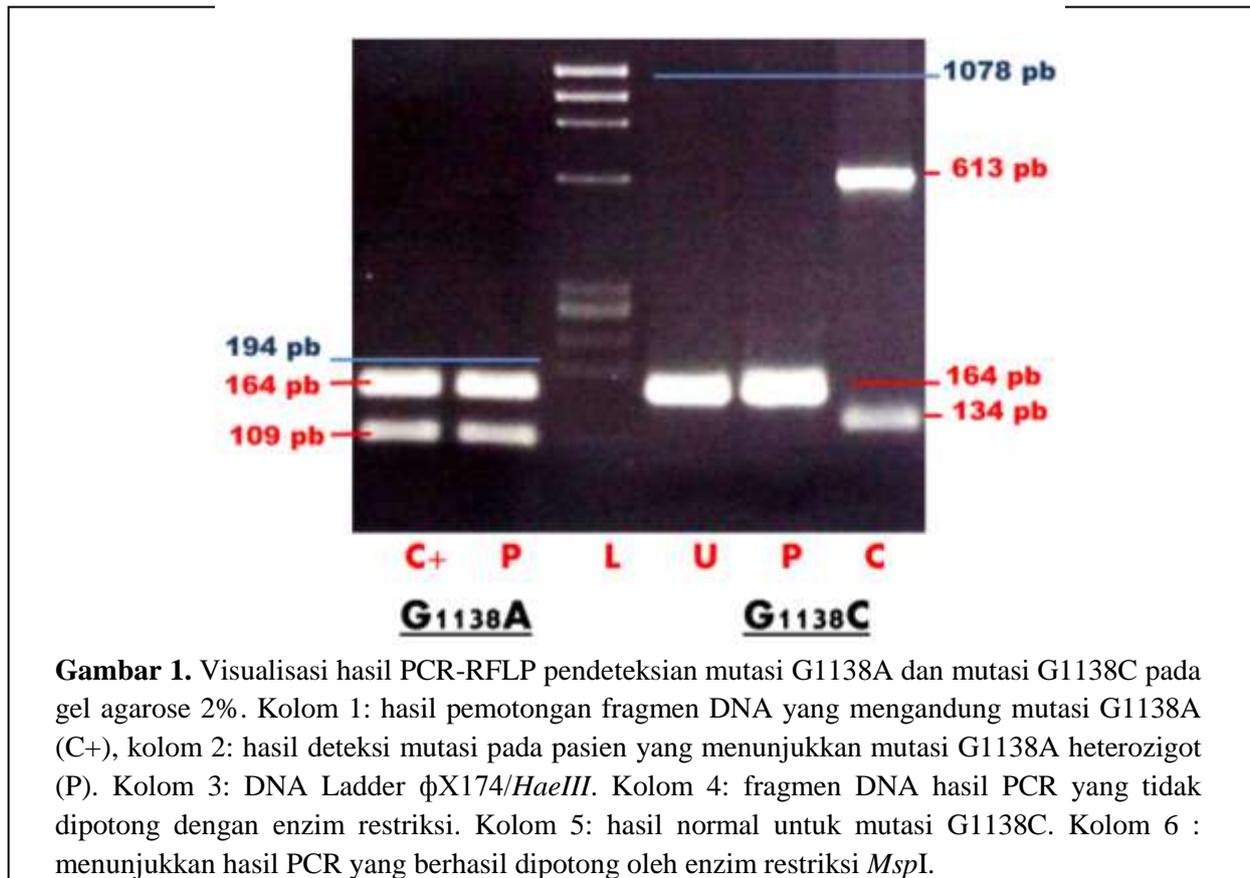
Sejak tahun 2006-2014, sebanyak 22 kasus suspek akondroplasia dirujuk ke Klinik GenNeka Lembaga Biologi Molekuler Eijkman oleh dokter spesialis anak dari Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM), Rumah Sakit Hermina dan Prodia Kramat untuk dideteksi jenis mutasinya. Pasien dengan rentang usia 1 hari - 8 tahun dirujuk dengan gejala klinis seperti: *short stature*, rhizomelik, *frontal bossing*, brachidactylia dan lordosis.

DNA diekstraksi dari sampel darah menggunakan *Wizard® Genomic DNA Purification Kit-Promega (Wisconsin, USA)*. Jenis mutasi G1138A dan G1138C dideteksi pada seluruh sampel dengan metode PCR-RFLP (*polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorfism*) dengan modifikasi metode seperti yang dideskripsikan oleh Shiang *et al.*⁸ Reaksi total PCR sebanyak 25µL terdiri dari 1x themopol buffer yang mengandung 20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 pH 8.8 (*New Englands Biolabs Inc*), 200µM dNTPs (*Invitrogen*), masing-masing 0.4µM primer forward FG10F 5'AGGAGCTGGTGGAGGCTGA-3' dan primer reverse FG10R 5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3', 0.625 Units Taq polimerase (*New Englands Biolabs Inc*) dan 100ng DNA genomik. Reaksi PCR dilakukan pada mesin *thermal cycler (Applied Biosystem 9700)* dengan kondisi sebagai berikut 95°C 5 menit inisiasi denaturasi, (95°C 30 detik, 65°C 30 detik, 72°C 1 menit) sebanyak 35 siklus dan 72°C selama 5 menit. Sebanyak 5µL produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% (LE agarose, Roche). Pita yang diharapkan untuk produk PCR sebesar 164pb. Ladder DNA φX174/HaeIII (*New Englands Biolabs Inc*) digunakan sebagai penanda ukuran DNA. Kemudian produk PCR ditambahkan dengan 10 Units *SfcI* untuk mendeteksi mutasi G1138A dan *MspI* untuk mutasi G1138C kemudian diinkubasi minimal selama 4 jam pada suhu 37°C. Produk RFLP dielektroforesis pada gel agarosa 2% (*LE agarose, Roche*) dan difoto menggunakan Gel DocTM XR Biorad. Jika terdapat mutasi G1138A pita DNA akan terpotong menjadi fragmen 109 pb dan 55pb. Sedangkan untuk mutasi G1138C pita DNA akan terpotong menjadi fragmen 107 pb dan 57pb.

HASIL

Pendeteksian mutasi G1138A dan G1138C dilakukan menggunakan metode PCR-RFLP, segmen DNA yang meliputi ekson 10 diamplifikasi menggunakan sepasang primer yang menghasilkan produk PCR dengan ukuran 164pb kemudian produk PCR tersebut dipotong dengan enzim *SfcI* dan *MspI*. Hasil PCR-RFLP (Gambar 1) menunjukkan hasil positif untuk mutasi G1138A dan negatif untuk mutasi G1138C. Pada setiap RFLP disertakan kontrol positif yaitu fragmen DNA yang memiliki situs pengenalan enzim restriksi *SfcI* dan *MspI*. Berbeda halnya dengan kontrol positif mutasi G1138A, kontrol positif untuk mutasi G1138C menggunakan fragmen DNA gen globin beta yang berukuran 749pb dimana pada fragmen tersebut terdapat situs pengenalan enzim restriksi *MspI* sehingga fragmen DNA terpotong menjadi 613pb, 134pb dan 2pb. Hal ini menunjukkan bahwa enzim restriksi *MspI* yang digunakan memang berfungsi dengan baik.

Tabel 1 menunjukkan jumlah kasus akondroplasia dan hasil deteksi mutasi kasus akondroplasia di Klinik GenNeka sejak periode 2006-2014. Hasil deteksi dengan PCR-RFLP menunjukkan 13 dari 22 pasien memiliki mutasi substitusi G1138A, dan tidak ditemukan jenis mutasi G1138C. Data ini menunjukkan bahwa mutasi G1138A yang melatarbelakangi sebagian besar kasus akondroplasia di Indonesia. Walaupun jika jumlah pasien lebih banyak kemungkinan menemukan jenis mutasi G1138C lebih besar.



PEMBAHASAN

Lebih dari 90% pasien akondroplasia dari beberapa etnik yang berbeda memiliki mutasi G1138A pada gen *FGFR3*.^{2,3} Hal yang sama terjadi di Indonesia yang menunjukkan bahwa sekitar 59 % (13/22) pasien akondroplasia memiliki mutasi G1138A. Mutasi tersebut predominan namun tidak mencapai 90% pada pasien di Indonesia. Sedangkan mutasi G1138C yang umumnya ditemukan sekitar 1% pada pasien,³ pada ke-22 kasus yang dikerjakan, jenis mutasi tersebut tidak terdeteksi. Hal ini disebabkan karena kemungkinan kasus akondroplasia Indonesia jarang. Jika jumlah pasien lebih banyak akan memperbesar kemungkinan jenis mutasi G1138C ditemukan pada pasien akondroplasia di Indonesia. Jumlah kasus yang sedikit dapat mengindikasikan bahwa kemungkinan *awareness* klinisi dan pasien

akan penyakit genetik ini kurang. Kemungkinan lainnya adalah jenis mutasi penyebab akondroplasia di Indonesia lebih beragam, sehingga deteksi mutasi jenis lain penyebab akondroplasia diperlukan seperti G375 dan G346E.^{1,6} Heuertz et al.⁹ melakukan sekuensing seluruh gen *FGFR3* untuk mendeteksi jenis mutasi yang melatarbelakangi pasien akondroplasia yang hasil PCR-RFLP menunjukkan negatif untuk mutasi G1138A dan G1138C. Pada studi tersebut ditemukan mutasi baru Y278C yang kemungkinan menyebabkan terbentuknya ikatan disulfida pada domain *immunoglobulin-like III* dengan fenotipe tampak sebagai akondroplasia atau hipokondroplasia berat.

Gen *FGFR3* yang terdiri dari 19 ekson merupakan pengkode protein *fibroblast growth factor receptor 3*. Protein *FGFR3* termasuk jenis reseptor tirosin kinase yang

berperan mengenali dan meneruskan sinyal *fibroblast growth factor* (FGF) yang menghambat proliferasi dan meningkatkan diferensiasi kondrosit. Penelitian yang dilakukan oleh Segev *et al.*¹⁰ menunjukkan mencit transgenik yang memiliki mutasi G380R, proliferasi kondrositnya terhambat dan differensiasinya meningkat, sehingga tulangnya lebih pendek jika dibandingkan dengan mencit *wild type*. Protein FGFR3 tersusun atas 840 asam amino dan terdiri dari 3 region yaitu region ekstraselular yang terdiri dari 3 domain *immunoglobulin-like loop* (IgI, IgII, IgIII), region transmembran (TM), dan region sitoplasmik yang terdiri dari 2 domain tirosin kinase yaitu tirosin kinase proksimal (TKp) dan tirosin kinase distal (TKd).⁵

Mutasi pada gen FGFR3 memiliki efek yang berbeda tergantung pada perubahan asam amino yang diakibatkan oleh mutasi tersebut. Substitusi pada domain *immunoglobulin-like* dan transmembran terutama perubahan suatu asam amino menjadi sistein (R248C, S249C, G370R, S371C, Y373C) melatarbelakangi tanatophorik displasia tipe I (TD I), sedangkan substitusi pada domain tirosin kinase K650E menyebabkan tanatophorik displasia tipe II (TD II).^{1,11} Tanatophorik displasia (OMIM: 187600) merupakan jenis skeletal displasia yang bersifat letal dengan manifestasi klinis lebih berat dari akondroplasia yaitu mikromelia berat, tulang femur melengkung pada TDI dan tulang femur lurus pada TDII, makrosepali, dan rongga torak yang sempit dengan rusuk yang pendek.^{7, 12} Sedangkan substitusi N540K pada domain pada tirosin kinase proksimal menyebabkan hipokondroplasia (OMIM: 14600) yaitu jenis skeletal displasia yang lebih ringan dibandingkan dengan akondroplasia dengan manifestasi klinis *short stature*, mikromelia

ringan, lordosis, dan retardasi mental ringan.^{1,12}

Manifestasi klinis yang beragam akibat mutasi pada gen FGFR3 diperkirakan akibat protein FGFR3 mengalami *gain-of-function*. Pada keadaan normal protein FGFR3 akan teraktivasi saat *fibroblast growth factor* (FGF) dan heparin berikatan dengan protein FGFR3. Aktivasi tersebut menyebabkan reseptor FGFR3 membentuk dimer dan meneruskan sinyal. Pada kasus skeletal displasia perubahan asam amino pada protein FGFR3 menyebabkan terbentuk ikatan disulfida atau ikatan hidrogen yang menstabilkan dimer FGFR3 sehingga dimer tersebut teraktivasi secara terus menerus walaupun tidak ada FGF yang berikatan.⁶ Pendapat lainnya mengatakan bahwa terjadi keterlambatan defosforilasi sehingga FGFR3 meneruskan sinyal secara terus menerus.¹²

Mutasi penyebab akondroplasia sebagian besar bersifat spontan (*de novo*). Hal ini dikaitkan dengan usia paternal diatas lebih dari 40 tahun (*late paternal age*). Mutasi ini diturunkan secara autosomal dominan, sehingga setiap anak yang lahir dari orang tua yang keduanya akondroplasia memiliki kemungkinan 25% normal, 50% akondroplasia, dan 25% letal.¹³ Deteksi akondroplasia dengan teknik biologi molekuler dapat digunakan sebagai cara untuk mengetahui kondisi janin lebih dini terutama bagi pasangan yang beresiko tinggi seperti pasangan akondroplasia dan calon ayah yang berusia lebih dari 40 tahun.

SIMPULAN

Pada studi ini, mutasi G1138A predominan namun tidak signifikan. Hal ini dapat menunjukkan bahwa mutasi yang melatarbelakangi akondroplasia di Indonesia mungkin lebih bervariasi sehingga perlu dilanjutkan untuk mendeteksi mutasi lain pada

gen FGFR3. Deteksi mutasi menggunakan teknik biologi molekuler ini sangat diperlukan untuk mengkonfirmasi pemeriksaan fisik terutama untuk pasangan yang ingin melakukan konseling genetik

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada dokter yang telah merujuk pasien untuk melakukan tes genetik di Klinik GenNeka Lembaga Eijkman. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Evira Putri Cahya, S.Si (Lembaga Eijkman), dr. Agung Nova Mahendra Jaya (Fakultas Kedokteran Universitas Udayana) dan Prof. dr. I Putu Sutisna, Sp.Par(K) (Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa) yang telah membantu dalam mempersiapkan naskah.

DAFTAR PUSTAKA

- Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet*. 2007;370:162-72
- Nahar R, Saxena R, Kohli S, Puri R, Verma IC. Molecular studies of achondroplasia. *Indian J Orthop*. 2009;43(2):194-196
- Pehlivan S, Ozkinay F, Okutman O, Cogulu O, Ozcan A, Cankaya T *et al*. Achondroplasia in Turkey is defined by recurrent G380R mutation of the FGFR3 gene. *Turk J Pediatr*. 2003;45:99-101
- Velonov M, Slaugenhaupt SA, Stoilov I, Scott Jr Cl, Gussella JF, Tsipouras P. The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p. *Nat Genet*. 1994;6:314-317
- Horton WA, Garofalo S, Lunstrum GP. FGFR3 signaling in achondroplasia: a review. *Cell Mater*. 1998; 8:83-87
- Webster MK, Donoghue DJ. 1997. FGFR activation in skeletal disorder: too much of a good thing. *Trend Genet*. 1997; 5(13):178-182
- Trujillo-Tiebas, Fenollar-Cortes M, Lorda-Sanchez, Diaz-Recasens J, Redondo AC, Ramos-Corrales C, Ayuso C. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to FGFR3 gene mutations. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26:455-460
- Shiang R, Thompson L, Zhu M, Church DM, Fielder TJ Bocian M, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 1994;78:335-342
- Heuertz S, Merrer ML, Zabel B, Wright M, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V, et al. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14:1240-1247
- Segev O, Chumakov I, Nevo Z, et al. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularisation and ossification in FGFR3 (G380R) transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:249-258
- Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, muenke craniosynostosis, and crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev*. 2000; 21(1):23-39
- Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Tanaka H, Seino Y. FGFR3-related dwarfism and cell signaling. *J Bone Miner Metab*. 2009;27:9-15
- Satiroglu-Taufan NL, Tufan AC, Semerci CN, Bagci H, et al. Accurate diagnosis of a homozygous G1138A mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene responsible for achondroplasia. *Tohoku J Exp Med*. 2006;208:103-7

KLONING GEN PENYANDI Ag85A *Mycobacterium tuberculosis*

Firdayanti^{1,2}, Ni Made Mertaniasih⁴, Ning Rintiswati¹, Wayan T. Artama³

¹Ilmu Kedokteran Tropis, UGM, ²Akademi Analisis Kesehatan Kendari, ³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM, ⁴Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

E-mail: firdayanti@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Antigen 85A (Ag85A) *Mycobacterium*, disandi oleh gen *fibronectin binding protein-A (fbp-A)* dengan ukuran nukleotida 1014 bp. Gen *fbp-A* penyandi protein dengan berat molekul 32 kDa yang merupakan salah satu protein yang disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium bovis*. Protein Ag85A berperan menginduksi proliferasi sel T yang kuat dan produksi IFN- γ di sebagian besar orang sehat yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* dan tikus yang divaksinasi BCG, namun demikian tidak ditemukan pada pasien Tuberkulosis atau kusta lepromatosa. Penelitian ini bertujuan melakukan amplifikasi dan kloning gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* pada *E. coli*.

Metode : Penelitian diawali dengan amplifikasi gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* dengan metode PCR menggunakan primer spesifik Ag85A *M. tuberculosis* yang dirancang dari genom *M. tuberculosis* strain H37Rv. Tahap kloning dimulai dari ligasi produk PCR ke dalam vektor pET SUMO dan ditransformasi ke dalam sel inang *E. coli* BL21. Pada klon bakteri yang diperoleh dilakukan identifikasi dengan metode PCR untuk mengetahui klon yang membawa gen *insert*.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan produk PCR hasil amplifikasi gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* menggunakan primer spesifik Ag85A *M. tuberculosis* diperoleh band spesifik dengan ukuran nukleotida 1017 bp, dan hasil kloning gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media Luria Bertani (LB) padat dengan kanamisin 50 μ g/ml. Hasil transformasi diperoleh empat koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat. Hasil uji tapis dengan metode PCR dari empat koloni bakteri *E. coli* ditemukan dua koloni yang positif membawa gen Ag85A sebesar 1017 bp.

Simpulan: Gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* berhasil dikloning ke dalam vektor pET SUMO dalam sel inang *E. coli* BL21.

Kata kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85A, kloning, PCR, pET SUMO

PENDAHULUAN

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang utama di dunia. *Mycobacterium tuberculosis*, agen penyebab Tuberkulosis (TB) yang menjadi infeksi utama terbesar penyebab kematian secara global.

Sekitar sepertiga dari populasi dunia telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan jumlah kasus baru yang timbul menyebabkan gangguan kesehatan antara jutaan orang setiap tahunnya. Berdasarkan data WHO, pada tahun 2012 diperkirakan 8,6 juta orang mendapatkan TB dan 1,3 juta orang meninggal akibat penyakit ini (termasuk 320.000 kematian

dengan HIV positif). Kasus terbanyak ditemukan di Asia Tenggara, Afrika, dan daerah Pasifik Barat¹.

Asia Tenggara dan wilayah Pasifik Barat secara kolektif menyumbang 58% dari kasus TB di dunia pada tahun 2012. Sementara itu, wilayah Afrika memiliki seperempat dari kasus TB di dunia, dan tingkat tertinggi kasus dan kematian dibandingkan dengan jumlah penduduk. India dan China memiliki jumlah kasus terbesar, Afrika Selatan dan Swaziland memiliki tingkat insiden tertinggi per kapita. Indonesia sendiri dilaporkan terdapat 331.424 kasus TB dari 247 juta populasi, dan 2.676 kasus TB dengan HIV positif berdasarkan data WHO tahun 2012. Berdasarkan data kasus tersebut, menempatkan Indonesia pada peringkat keempat untuk kasus TB di dunia^{1,2}.

Beberapa strategi pengendalian TB dilakukan untuk eliminasi dan meminimalisir kasus TB secara global, termasuk program DOTS dan penggunaan vaksin. Program *Directly Observed Treatment Shortcourse* (DOTS) dan penggunaan vaksin BCG memiliki sedikit dampak terhadap kejadian TB dan memburuk dalam beberapa kasus. Meskipun WHO memperkirakan bahwa aplikasi luas pengobatan yang diamati secara langsung, strategi DOTS jangka pendek dapat mengurangi beban TB global sebesar 50% dalam waktu 10 tahun^{3,4}.

Penggunaan vaksin BCG adalah yang paling banyak diberikan dari semua vaksin dan memiliki cakupan tertinggi dari setiap vaksin pada program imunisasi WHO, tampaknya memiliki dampak epidemiologi yang kecil pada TB³. BCG diketahui melindungi anak-anak terhadap bentuk parah dari TB namun tidak efisien dan konsisten melindungi orang dewasa terhadap bentuk paling umum dari penyakit ini, yaitu TB paru (perlindungan berkisar 0% sampai 80%), BCG juga tidak memberi

perlindungan dari pembentukan TB laten dan reaktivasi berikutnya⁵.

Sebagai upaya, penelitian besar sedang dilakukan untuk mengembangkan vaksin TB baru. Banyak dari penelitian ditujukan untuk meningkatkan pemahaman tentang imunopatogenesis TB dengan mempelajari organisme penyebab infeksi dan host manusia. Para peneliti telah mengurutkan genom lengkap dari *M. tuberculosis*, yang akan memberikan kesempatan untuk menjawab pertanyaan mengenai virulensi, patogenesis, dan persisten. Pada saat yang sama, kandidat vaksin baru (misalnya, vaksin subunit, vaksin DNA, dan strain mikobakteri hidup yang dilemahkan) sedang dikembangkan dan diuji pada hewan model⁶.

Protein ekskretori (*Secreted Protein*) dan protein permukaan dinding sel yang terpajan adalah antigen besar yang dikenali oleh sistem imun terhadap infeksi *M. tuberculosis* dan *M. bovis*. Pada penelitian dengan tikus dan kelinci percobaan menunjukkan imunisasi dengan seluruh filtrat kultur, sumber kaya protein ekstraseluler dapat melindungi hewan coba sampai batas tertentu terhadap infeksi berikutnya dengan basil tuberkel⁵. Sebuah fraksi utama dari protein ekskretori (*Secreted Protein*) filtrat kultur *M. tuberculosis* dan *M. bovis* BCG adalah kompleks Ag85. Protein antigen 85 (Ag85) yang disekresikan terdapat pada permukaan dinding sel *Mycobacterium*. Ekspresi Ag85 diperlukan untuk kelangsungan hidup *M. tuberculosis* dalam makrofag dan dianggap sebagai faktor virulensi. Tiga anggota protein Ag85 dengan 30-32 kD (Ag85A, Ag85B dan Ag85C), yang masing-masing memiliki aktivitas enzimatis mycolyl-transferase yang diperlukan untuk biogenesis faktor penghubung (trehalosa-dymycolate). Protein yang dikodekan oleh tiga gen paralogous (fbpA, fbpB dan fbpC) terletak di daerah yang berbeda dari genom bakteri.

Kebanyakan studi imunologi telah difokuskan pada Ag85A dan Ag85B, sedikit yang diketahui tentang anggota ketiga protein ini, Ag85C⁷. Kedua protein Ag85A dan Ag85B adalah kandidat yang menjanjikan untuk vaksin tuberkulosis di masa depan.

Banyak penelitian pada hewan model menunjukkan bahwa vaksinasi dengan rekombinan DNA Ag85A atau protein Ag85A dapat menginduksi respon imun yang kuat dengan sekresi sitokin Th1 yang signifikan (IL-2 dan IFN- γ) yang penting dalam mengatur sejumlah sel-sel imun dan menginduksi sel sitotoksik⁸.

Antigen 85A (Ag85A) *Mycobacterium*, yang dikodekan pada *fibronectin binding protein-A* (fbp-A) dengan 1014 bp dan berat molekul 32 kD, merupakan salah satu protein yang disekresikan oleh *M. tuberculosis* dan *M. bovis*. Protein Ag85A menginduksi proliferasi sel T yang kuat dan produksi IFN- γ di sebagian besar orang sehat yang terinfeksi *M. tuberculosis*, *M. leprae* dan tikus yang divaksinasi BCG, tapi tidak pada pasien Tuberkulosis atau kusta lepromatosa. Gangguan gen *encoding* Ag85A pada *M. tuberculosis*, fbpA, menghasilkan strain yang gagal untuk memanipulasi makrofag manusia atau tikus menunjukkan bahwa Ag85A mungkin memainkan peran kunci terhadap patogenesis *M. tuberculosis*^{7,8}.

Adanya bukti bahwa beberapa protein ekskretori (*secreted protein*) *M. tuberculosis* berperan penting terhadap patogenesis penyakit dan imunostimulan yang secara langsung berinteraksi dengan sistem imun host yang menunjukkan janji besar sebagai potensi target vaksin, termasuk Ag85A dan Ag85B yang sering digunakan sebagai antigen dalam vaksin TB saat ini dalam uji klinis. Keduanya terutama diekspresikan selama tahap awal infeksi, yang mana *M. tuberculosis* membagi dengan cepat dan berperan dalam sintesis dan perakitan

komponen dinding sel. Bila tingkat pertumbuhan menurun, maka sintesis *mycolyl transferase* kurang dibutuhkan dan ekspresi protein Ag85A akan berkurang. Oleh karena itu, dilakukan langkah untuk menuju identifikasi target vaksin yang memiliki profil ekspresi yang lebih konstitutif dan kemudian dilakukan uji efektivitas perlindungan dari vaksin TB. Salah satu langkah yang dapat dilakukan adalah dengan penggunaan protein rekombinan untuk memproduksi protein Ag85A dalam skala besar.

Protein rekombinan adalah suatu protein yang dikode oleh urutan DNA yang telah mengalami rekombinasi dan disebut rekombinasi DNA. Rekombinasi DNA adalah penggabungan segmen-segmen DNA target dengan DNA vektor, yaitu plasmid yang terdapat di dalam bakteri dengan jumlah yang besar⁹. Alasan penggunaan protein rekombinan karena produksi protein rekombinan dapat dibuat dalam skala besar dengan waktu yang singkat karena produksi protein dibantu oleh bakteri sehingga dapat digunakan untuk uji imunogenisitas sebagai evaluasi vaksin.

Produksi Ag85A yang dilakukan dengan teknologi rekombinan menggunakan bantuan bakteri *Escherichia coli* sebagai inang. Teknologi rekombinan dapat dilakukan melalui tahap amplifikasi, kloning, dan ekspresi molekuler. Amplifikasi Ag85A adalah salah satu prosedur yang menentukan keberhasilan pembuatan protein rekombinan. Amplifikasi Ag85A bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode PCR dan menggunakan primer spesifik Ag85A sehingga reaksi penggandaan DNA terjadi pada target DNA yang diinginkan. Fragmen DNA yang mengandung gen target yang berhasil diamplifikasi dilakukan penyisipan ke dalam vektor yang berperan sebagai pembawa gen yang akan dikloning ke dalam sel inang. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan amplifikasi gen

penyandi Ag85A dengan menggunakan desain primer spesifik yang dirancang sendiri dari genom strain *M. tuberculosis* H37Rv, dan kloning gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* dengan menggunakan vektor pET SUMO dan ditransformasi ke dalam *E. coli* BL21.

METODE

Amplifikasi gen Ag85A

Gen Ag85A diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik yang didesain dari genom strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan primer forward 5'TGGATGCGTTGAGATGAGGATGAG3' dan primer reverse 3'GTTTCCTAAATCCCGTCCCTAGCT5' yang menghasilkan 1017 bp fragmen. Amplifikasi dilakukan dengan tahap pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, 35 siklus amplifikasi (denaturasi 94°C selama 1 menit, aneling 54°C selama 1 menit, elongasi 72°C selama 1 menit), dan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Deteksi Produk PCR dan Sekuensing

Produk PCR hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2% yang dilarutkan dalam 1,0 X TBE (Tris-borat-EDTA). Hasil elektroforesis berupa pita DNA diamati di bawah sinar UV. Sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia.

Kloning Ag85A

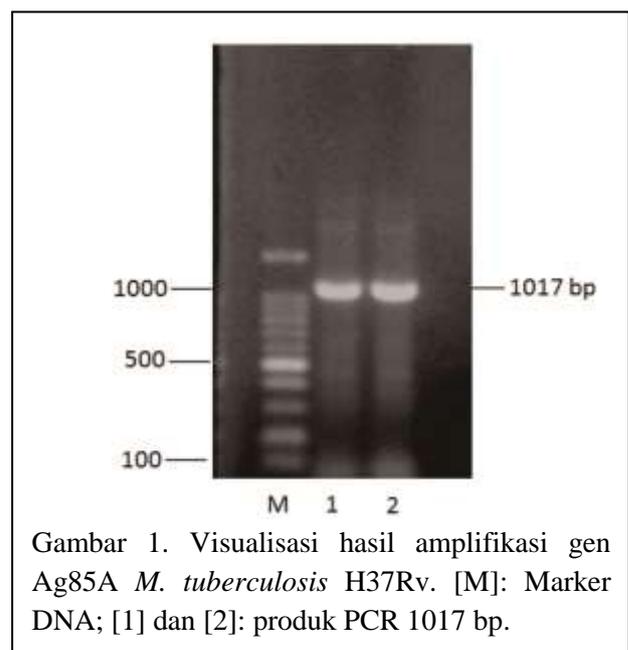
Prosedur kloning terdiri dari ligasi dan transformasi. Proses ligasi dilakukan berdasarkan *Champion™ pET SUMO Protein Expression System, Invitrogen kits*. Ligasi dilakukan dengan membuat Plasmid DNA di dalam tube dengan komposisi 2 µL Produk PCR fresh, 1 µL 10x *Ligation Buffer*, 2 µL pET Sumo Vektor, 4 µL *Steril Water*, dan 1 µL T4 DNA Ligase. Hasil ligasi diinkubasi 15°C selama minimal 4 jam (12°C/overnight). Simpan

ligasi pada suhu -20°C sampai siap untuk transformasi.

Transformasi dilakukan menggunakan *E. coli* BL21 sebagai sel inang untuk mengekspresikan DNA rekombinan menjadi protein karena adanya T7 RNA polimerase yang akan dikenali oleh promoter T7 vektor ekspresi pET. Transformasi yang dilakukan berdasarkan *Champion™ pET SUMO Protein Expression System, Invitrogen kits, E. coli* BL21 ditambahkan dengan plasmid DNA dan SOC medium melalui proses tertentu dan diinkubasi 37°C selama 1 jam dengan shaker. Hasil transformasi ditambahkan pada 10 mL medium LB padat yang telah mengandung 50 µg/ml kanamisin pada cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

HASIL

Gen Ag85A diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer spesifik Ag85A yang didesain menggunakan genom strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Hasil amplifikasi divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 2% (Gambar 1).



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi gen Ag85A *M. tuberculosis* H37Rv. [M]: Marker DNA; [1] dan [2]: produk PCR 1017 bp.

Hasil visualisasi amplifikasi gen penyandi Ag85A dari genom strain *M. tuberculosis* H37Rv dengan elektroforesis gel agarosa 2% memperlihatkan fragmen DNA dari kedua sampel berukuran 1017 bp. Selanjutnya fragmen

DNA yang berukuran 1017 bp dilakukan sekuensing untuk mengkonfirmasi gen penyandi Ag85A, dan memperlihatkan hasil sekuensing seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

```
#MEGA
!Title fasta file;
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
  NSeqs=3 NSites=1017
  Identical=. Missings? Indel=;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#159684_Ag85A_Fr_Ag85A_F
Query 1 ATGCAGCTTCCTTACAGCGCTTCCTGCCGCCCTCACGGCTATGTCGGCTCGACTCGTGCTC 60
Sbjct 1 ATGCAGCTTCCTTACAGCGCTTCCTGCCGCCCTCACGGCTATGTCGGCTCGACTCGTGCTC 60
Query 61 GGGGCCCTCGGCCGGGCCCTACTGTCTGGCTCTGCTCGGCCCTCCTGGTGGCACTGGCCGAC 120
Sbjct 61 GGGGCCCTCGGCCGGGCCCTACTGTCTGGCTCTGCTCGGCCCTCCTGGTGGCACTGGCCGAC 120
Query 121 GCGGGGGCATTTTCCCGCCCGGCTTGCGGTGGAGTACC TGCAAAGT GCCGT CGC CGTCG 180
Sbjct 121 GCGGGGGCATTTTCCCGCCCGGCTTGCGGTGGAGTACC TGCAAAGT GCCGT CGC CGTCG 180
Query 181 ATGGCCCTGACATCAAGGCTCCAATTCCAAAGTGGCGGTGCCAATTCGCCGCCCTGTAC 240
Sbjct 181 ATGGCCCTGACATCAAGGCTCCAATTCCAAAGTGGCGGTGCCAATTCGCCGCCCTGTAC 240
Query 241 CTGCTCGACGGCTCGCGCCGCCAGGACGACTTCAGCGGCTGGGACATAAACACCCCGGC 300
Sbjct 241 CTGCTCGACGGCTCGCGCCGCCAGGACGACTTCAGCGGCTGGGACATAAACACCCCGGC 300
Query 301 TTCGACTGCTACGACCACTGGCCCTGCTGCTCATGCGGTGGTGGTGGCCAGTCAAGC 360
Sbjct 301 TTCGACTGCTACGACCACTGGCCCTGCTGCTCATGCGGTGGTGGTGGCCAGTCAAGC 360
Query 361 TTCGACTGCTACGACCACTGGCCCTGCTGCTCATGCGGTGGTGGTGGCCAGTCAAGC 420
Sbjct 361 TTCGACTGCTACGACCACTGGCCCTGCTGCTCATGCGGTGGTGGTGGCCAGTCAAGC 420
Query 421 GAGACTTCC TGACCAGCGAGCTGCCGGGGTGGCTGCAGGCCAACAGGCCAGTCAAGCCC 480
Sbjct 421 GAGACTTCC TGACCAGCGAGCTGCCGGGGTGGCTGCAGGCCAACAGGCCAGTCAAGCCC 480
Query 481 ACCCGAAGCGCCCTCCTCGCTCTTTCCATGCTGCTGCTTCTTCCGGCTGACGC TGGCGATC 540
Sbjct 481 ACCCGAAGCGCCCTCCTCGCTCTTTCCATGCTGCTGCTTCTTCCGGCTGACGC TGGCGATC 540
Query 541 TATCAACCCTAGCAGTTCTCTACCGGGAGCGATGTCGGGCTGTGTTGGACCCTCCAG 600
Sbjct 541 TATCAACCCTAGCAGTTCTCTACCGGGAGCGATGTCGGGCTGTGTTGGACCCTCCAG 600
Query 601 GGGATGGGTCCTACCCTGATCGGCC TGGGATGGGTCAGGCTGGCGGCTACAAGGCC TCC 660
Sbjct 601 GGGATGGGTCCTACCCTGATCGGCC TGGGATGGGTCAGGCTGGCGGCTACAAGGCC TCC 660
Query 661 GACATCTGGGCCCGCAACGAGCCCGCCCTGCCAGCGCAACGACCCCTCTGTAACGTC 720
Sbjct 661 GACATCTGGGCCCGCAACGAGCCCGCCCTGCCAGCGCAACGACCCCTCTGTAACGTC 720
Query 721 GGGAAAGCTGATCGCCAAACAACCCGCCGTC TGGGTGTACTGCGGCAACGGCAAGCCGTC 780
Sbjct 721 GGGAAAGCTGATCGCCAAACAACCCGCCGTC TGGGTGTACTGCGGCAACGGCAAGCCGTC 780
Query 781 GATCTGGTGGCAACAACTGCCGGCCAAAGTTCCTCGAGGCTTCTCTCGGCAACGCAAC 840
Sbjct 781 GATCTGGTGGCAACAACTGCCGGCCAAAGTTCCTCGAGGCTTCTCTCGGCAACGCAAC 840
Query 841 ATCAACTTCCAAAGCGCTACAACCGCCGCTGGGGCCAAACGGCTCTTCCACTTCCCG 900
Sbjct 841 ATCAACTTCCAAAGCGCTACAACCGCCGCTGGGGCCAAACGGCTCTTCCACTTCCCG 900
Query 901 GACAGCGGTACGCGACAGCTGGGAGTAC TGGGGCGCGCAGCTCAACGC TATGAAGCCGAC 960
Sbjct 901 GACAGCGGTACGCGACAGCTGGGAGTAC TGGGGCGCGCAGCTCAACGC TATGAAGCCGAC 960
Query 961 CTGCAACCGGCACTGGCTGCCCAAGCCGCTGCCGGCCCGCCAGCGCCCTAG 1017
Sbjct 961 CTGCAACCGGCACTGGCTGCCCAAGCCGCTGCCGGCCCGCCAGCGCCCTAG 1017
```

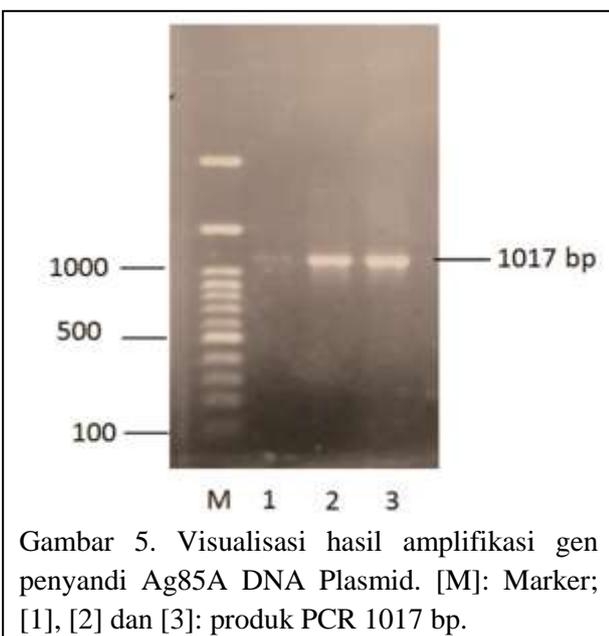
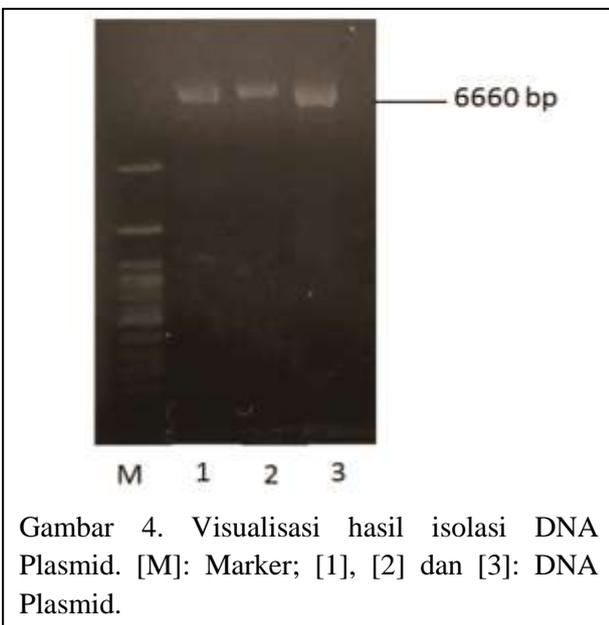
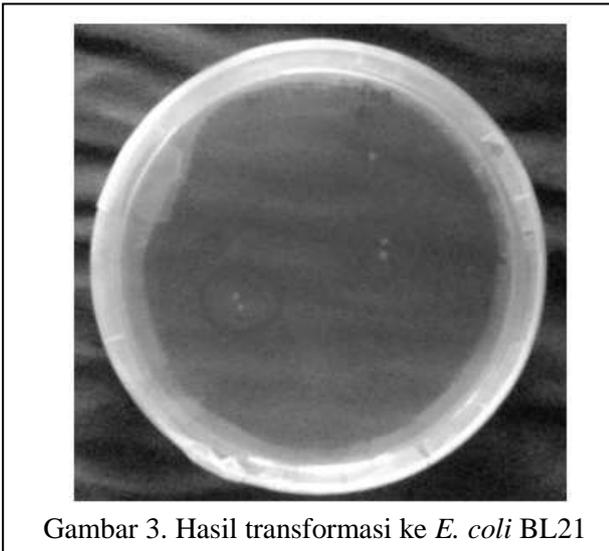
Gambar 2.

Hasil ligasi antara DNA Ag85A insert ke vektor pET SUMO ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21 sebagai sel inang. Hasil transformasi yang ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat dengan penambahan kanamisin 50 µg/ml berjumlah empat koloni (Gambar 3).

Empat koloni bakteri yang diperoleh dilakukan isolasi DNA Plasmid untuk mengidentifikasi gen Ag85A insert ke vektor

pET SUMO. Hasil isolasi DNA plasmid divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 2% (Gambar 4).

Hasil isolasi DNA plasmid dilakukan amplifikasi untuk mengidentifikasi gen insert dengan menggunakan primer spesifik Ag85A. Hasil amplifikasi divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 2% (Gambar 5).



Hasil amplifikasi gen Ag85A dari DNA plasmid menunjukkan bahwa dua koloni bakteri memberi hasil positif membawa gen Ag85A.

PEMBAHASAN

Gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik Ag85A yang dirancang dari genom *M. tuberculosis* strain H37Rv. Genom *M. tuberculosis* strain H37Rv telah dimanfaatkan oleh Lee, et al. untuk amplifikasi gen Ag85A menggunakan primer spesifik Ag85A dengan metode PCR. Pada penelitian ini, hasil amplifikasi gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* diperoleh band spesifik dengan ukuran nukleotida 1017 bp dan hasil sekuensing untuk mengkonfirmasi gen penyandi Ag85A menunjukkan fragmen DNA berukuran 1017 bp. Amplifikasi dan sekuensing gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* telah dilakukan oleh Lee et al., Borremans et al. dan Guerrini et al. yang memperoleh fragmen DNA Ag85A berukuran 1017 bp dan menunjukkan hasil yang sama pada penelitian ini.

Pada penelitian ini, metode kloning dilakukan untuk memasukkan produk PCR hasil amplifikasi gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* ke vektor pET SUMO berdasarkan protokol *Champion™ pET SUMO Protein Expression System, Invitrogen kits*. Pemotongan gen sisipan atau plasmid pada proses ligasi tidak perlu dilakukan pada metode kloning ini. Vektor pET SUMO memiliki desain yang mempermudah satu tahap strategi kloning yaitu dengan penyisipan langsung produk PCR ke dalam vektor. Taq polimerase dari produk PCR memiliki aktivitas *non template dependent* yang menambahkan *deoxyadenosine* (A) tunggal ke ujung 3'. Desain vektor pET SUMO yang digunakan memiliki residu 3' *deoxythymidine* (T) tunggal yang dapat berikatan dengan *deoxyadenosine* (A) tunggal dari produk PCR sehingga memungkinkan penyisipan produk

PCR untuk efisiensi ligasi ke vektor. Gen penyandi Ag85A berhasil disisipkan ke dalam vektor pET SUMO dan dapat ditransformasi ke dalam *E. coli* BL21. Transformasi ke dalam *E. coli* BL21 bertujuan untuk memperbanyak dan pemeliharaan plasmid rekombinan dengan stabil. Hasil transformasi yang ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat dengan penambahan kanamisin 50 µg/ml diperoleh empat koloni bakteri. Koloni bakteri *E. coli* BL21 yang tumbuh pada media seleksi dengan kanamisin disebabkan oleh bakteri *E. coli* BL21 membawa vektor pET SUMO. Vektor pET SUMO memiliki gen penanda resisten terhadap kanamisin sehingga bakteri dapat tumbuh.

Koloni bakteri yang diperoleh dilakukan isolasi DNA plasmid dan hasil isolasi DNA plasmid divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 2%. Vektor pET SUMO memiliki ukuran 5643 bp dan DNA Ag85A sisipan memiliki ukuran nukleotida 1017 bp, sehingga menghasilkan vektor rekombinan berukuran 6660 bp yang terlihat pada hasil isolasi DNA plasmid yang divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 2%. Uji tapis dilakukan pada hasil isolasi DNA plasmid bakteri dengan metode PCR untuk mengidentifikasi koloni bakteri yang membawa gen *insert*. Hasil uji tapis dari empat koloni bakteri *E. coli* BL21 ditemukan dua koloni bakteri yang positif membawa gen Ag85A. Gen *insert* ditunjukkan dari hasil isolasi plasmid koloni bakteri *E. coli* BL21 yang diampifikasi dengan primer spesifik Ag85A menunjukkan band spesifik dengan ukuran nukleotida 1017 bp.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kloning dan ekspresi gen penyandi Ag85A *M. tuberculosis* telah berhasil dilakukan dengan hasil kloning dan ekspresi protein yang stabil dan diproduksi dalam skala besar. Beberapa laporan yang menggambarkan kloning dan ekspresi gen penyandi Ag85A pada vektor

yang berbeda-beda. Xie *et al.* pada tahun 2002 melakukan kloning dan ekspresi imunodominan Ag85A ke plasmid PBK-CMV yang rekombinannya ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* XL-1 *blue* MRF dan IPTG digunakan sebagai inducer untuk ekspresi dari protein. Hasil ekspresi protein yang diperoleh stabil dengan berat molekul 32 kDa yang dikarakterisasi dengan menggunakan SDS-PAGE dan *Western blotting*. Lakey *et al.*, pada tahun 2000 melakukan kloning dan ekspresi Ag85A dan Ag85B, dengan menggunakan vektor *pTrcHisB* dan *E. coli* TOP10 sebagai ekspresi *host* untuk ekspresi protein rekombinan. Studi ini mengklaim bahwa *pTrcHisB* vektor mengatasi masalah persentase G+C rendah di genom *E. coli*.

SIMPULAN

Gen penyandi Ag85A *Mycobacterium tuberculosis* berhasil dikloning ke dalam vektor pET SUMO dalam sel inang *E. coli* BL21.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK. (K) melalui RINAS (Riset Nasional) yang telah memberikan dukungan dana pada penelitian ini, kepada Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan UGM yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini, serta kepada program studi Ilmu Kedokteran Tropis UGM dan Akademi Analis Kesehatan yang mendukung peneliti pada pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2013. WHO/HTM/TB/2013.11. World Health Organization, France;2013.
2. World Health Organization. Estimates of TB and MDR-TB burden are produced by WHO in consultation with countries. who.int/tb/data: 2014.

3. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO press, World Health Organization, 20 Avenue, 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO Report 2010.
4. Murphy, D. J., and Brown, J. R. Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect Dis.* 2007;7:84.
5. Zvi, A., Naomi A., John F., Jerald C. S., and Avigdor S. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomics.* 2008; 1:18.
6. MMWR. Development of New Vaccines for Tuberculosis, Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET). Atlanta, Georgia 30333. CDC. 1998 August; 47(13).
7. Kuo, C. J., Christopher P., Ching L., Bruce L., and Yung F. Elastin, a Novel Extracellular Matrix Protein Adhering to Mycobacterial Antigen 85 Complex. *J Biol Chem.* 2013. 288(6): 3886–3896.
8. Wang, D., Jia X., Yonghui F., Ying L., Solum M., Fengping, S., Jin-Ichi S., and Chanlong L. Liposomal oral DNA vaccine (mycobacterium DNA) elicits immune response. *Vaccine.* 2010; 28:3134–3142.
9. Mullis, B. K. Recombinant DNA technology and molecular cloning, Chapter 8. *Sci American.* 1990; 262:36.
10. Lee, C.F., Chang, S.Y. and Yu, D.S. Mycobacterium tuberculosis secreted antigen Ag85A gene. Division of Urology, Department of Surgery, No 325, Sec 2, Cheng-Kung Rd., Neihu 114, Taipei, Taiwan 114, R.O. China; 2002.
11. Borremans, M., de Wit, L., Volckaert, G., Ooms, J., de Bruyn, J., Huygen, K., van Vooren, J.P., Stelandre, M., Verhofstadt, R. and Content, J. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1989; 57 (10); 3123-3130.
12. Guerrini, V., Santoro, F. and Pozzi, G. Genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37RvSiena strain. Italy: Medical Biotechnology, University of Siena, viale Bracci, Policlinico Le Scotte, Siena 53100; 2013.
13. Xie, Y., Bao, H. U., C. Zhang, W., and Chen, W. Molecular Cloning and Expression of The Immunodominant Protein Ag85A from *M. tuberculosis* H37Rv strain. *J West China.* 2002; 33:172-174.
14. Lakey, D. L., Voladri, R. K., Edwards, K. M., Hager, C., Samten, B., Wallis, R. S., *et al.* Enhanced production of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Escherichia coli* by replacement of low-usage codons. *Infect Immun.* 2000; 68 (1):233- 8.

PENGARUH HIPERGLIKEMIA TERHADAP *HIGH SENSITIVE C REACTIVE PROTEIN* (Hs-CRP) PADA PENDERITA DIABETES MELITUS TIPE 2

Eti Yerizel¹; Putra Hendra²; Zulkarnain Edward²; Hafni Bachtiar³

¹Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

²Fakultas Kedokteran Universitas Batam

³Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

E-mail: ety_yerizel@yahoo.co.id

ABSTRAK

Latar Belakang: Hiperglikemia pada DM menyebabkan stres oksidatif dan peningkatan ROS (*reactive oxygen species*). Hiperglikemia intrasel menyebabkan peningkatan sintesis diasilgliserol yang menyebabkan ekspresi PKC dalam sel juga meningkat. Peningkatan aktivasi PKC mengakibatkan peningkatan NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) yang merupakan *Proinflammatory gene expresion* sehingga akan meningkatkan factor-faktor inflamasi antara lain IL-6 dan TNF- α yang pada akhirnya memacu hepar memproduksi CRP.

Metode: Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Cross Sectional* dengan *study comparative*. Sampel penelitian adalah 35 penderita DM tipe 2 yang mempunyai kadar glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dl atau kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dl, umur 30 -60 tahun yang menjalani rawat jalan dan atau rawat inap di bagian penyakit dalam rumah sakit di kota Batam. Sebagai kontrol adalah 35 orang sehat yang tidak menderita DM. Pemeriksaan kadar Hs-CRP dengan metode ELISA.

Hasil: Rata-rata kadar Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 sebesar $8,43 \pm 0,37$ ng/ml sedangkan non DM rata-rata $0,84 \pm 0,20$ ng/ml. Terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata kadar Hs-CRP penderita DM tipe 2 dan non DM ($p < 0,05$). Terdapat korelasi antara kadar glukosa darah puasa dengan kadar Hs-CRP dengan $p < 0,05$.

Kesimpulan: Kadar Hs-CRP penderita DM tipe 2 lebih tinggi dari pada yang terdapat pada orang sehat dan berkorelasi dengan kadar glukosa.

Kata kunci: DM tipe 2, hyperglycemia, ROS, Hs-CRP

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) telah menjadi masalah kesehatan yang dihadapi oleh seluruh Negara di dunia, tidak satu Negara pun kebal terhadap DM. Menurut International Diabetes Federation (IDF), saat ini angka pengidap diabetes di seluruh dunia mencapai angka 285 juta jiwa¹. WHO memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM di Indonesia dari 8,4 juta pada

tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030. Senada dengan WHO, IDF pada tahun 2009 memprediksi kenaikan jumlah penyandang DM dari 7,0 juta pada tahun 2009 menjadi 12,0 juta pada tahun 2030 atau meningkat dua sampai 3 kali pada tahun 2030.² DM terdiri dari dua tipe yaitu tipe 1 yang disebabkan kelainan genetik dan tipe 2. Secara umum, hampir 80% prevalensi diabetes melitus adalah DM tipe 2.

Keadaan hiperglikemia kronis dapat menyebabkan kelainan hampir seluruh jaringan tubuh, terutama pada jaringan yang dipengaruhi insulin.³ Proses kerusakan pada umumnya berawal dari adanya kelainan pembuluh darah mikro dan makrovaskuler. Komplikasi mikrovaskuler meliputi nefropati, retinopati dan neuropati, sedangkan makrovaskular meliputi penyakit jantung iskemik, stroke dan penyakit vaskular perifer⁴. Hiperglikemia mengakibatkan kerusakan pada mitokondrial yang selanjutnya akan memicu timbulnya berbagai jenis *reactive oxygen species* (ROS). Contoh dari radikal bebas seperti Superoxide (O₂⁻), Hydroxyl (OH), Peroxyl (RO₂), Nitric oxide (NO) dan Nitrogen dioxide (NO₂⁻). Peningkatan ROS dapat mengakibatkan kerusakan makromolekul seperti lipid berupa lipid peroksidasi, Protein teroksidasi dan juga kerusakan DNA merupakan kunci terhadap patogenesis terjadinya kerusakan berbagai jaringan tubuh yang merupakan komplikasi dari DM.^{4,5,8} Peningkatan radikal bebas dapat menimbulkan stress oksidatif yaitu suatu keadaan dimana antioksidan endogen tubuh tidak dapat meredam radikal bebas.^{6,7,12}

Mekanisme kerusakan jaringan tubuh pada DM adalah melalui *polyol pathway*, pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs), peningkatan aktivasi protein kinase C (PKC) melalui peningkatan *diacyl glycerol* (DAG), dan *hexosamine pathway*.³ Hiperglikemia intrasel menyebabkan peningkatan sintesis DAG yang menyebabkan ekspresi PKC dalam sel juga meningkat yang pada akhirnya akan mengubah berbagai macam ekspresi gen yang secara keseluruhan merusak pembuluh darah. Peningkatan aktivikasi PKC mengakibatkan peningkatan *nuclear factor kB* (NF- κ B) yang merupakan proinflammatory gene expression sehingga akan meningkatkan faktor2 inflamasi antara lain interleukin 6 (IL-

6) dan TNF alpha yang akan memacu hepar memproduksi C-reactive protein (CRP).^{3,11,13}

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelainan vaskuler terjadi karena adanya *low grade chronic inflammation* pada endotelium. Keadaan tersebut diperkuat dengan peningkatan beberapa marker inflamasi khronis seperti IL-6 dan high sensitive CRP (Hs-CRP) . Penelitian menunjukkan bahwa Hs-CRP merupakan marker yang cukup sensitif untuk mendeteksi adanya inflamasi subklinis tersebut.^{9,10,11}

METODE

Desain Penelitian adalah observasional analitik cross sectional dengan populasi penderita DM yang berobat di beberapa Rumah Sakit Batam yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak masuk dalam kriteria eksklusi. Korelasi diukur dengan menggunakan uji korelasi Pearson atau Spearman (sesuai normalitas data). Penelitian ini dilaksanakan di Bagian Penyakit Dalam di beberapa Rumah Sakit di Batam. Pemeriksaan kadar Hs-CRP di laboratorium Biomedik Fakultas kedokteran Universitas Andalas Padang.

Populasi penelitian ini adalah seluruh penderita DM tipe 2 yang mempunyai kadar glukosa darah puasa > 126 mg/dl. yang menjalani rawat jalan dan rawat inap di bagian penyakit dalam di beberapa rumah sakit di Batam. *Sampling* dilakukan secara random pada penderita DM Tipe 2 yang mempunyai kriteria eksklusi dan inklusi. Sebagai kontrol adalah orang sehat yang tidak menderita DM.

Besar sampel

Jumlah sampel diambil dengan menggunakan rumus :

$$n_1 = n_2 = Z^2 \cdot P \cdot Q / d^2 \text{ (Kutipan Notoatmodjo S,2002)}$$

$$n_1 = n_2 = 35$$

Jumlah sampel minimal pada setiap kelompok adalah 35 orang. Sampel darah vena sebanyak 10 ml.

Kriteria Inklusi Subyek :

- a. Penderita DM Tipe 2
- b. Bersedia menandatangani *informed consent*
- c. Umur berkisar antara 30 s/d 60 tahun

Kriteria Eksklusi Subyek:

Penderita penyakit kronis seperti penyakit hati, ginjal, hipertensi, rheumatoid arthritis, penyakit paru kronis, gastroenteritis.

Variabel Independen: kadar Hs-CRP dan kadar glukosa darah.

HASIL

Karakteristik sampel subjek penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil tersebut terlihat bahwa umur rata rata penderita

DM tipe 2 adalah $45,31 \pm 8,53$ dan non DM adalah $30,65 \pm 6,14$, rata rata kadar glukosa darah adalah $147,31 \pm 14,57$ mg/dl pada DM tipe 2 dan $74,02 \pm 7,84$ mg/dl pada non DM. Kadar HbA1c $8,87 \pm 1,48$ % pada DM tipe 2, dan IMT pada DM tipe 2 adalah $23,79 \pm 1,63$ dan pada non DM $20,81 \pm 1,98$. Berdasarkan jenis kelamin (Tabel 2) penderita DM tipe 2 laki laki sebanyak 20(57,1%) dan perempuan 15(42,9%), kelompok non DM jumlah laki laki 6(17,1%) dan perempuan 29(82,9%), masing masing total 35.

Kadar rata rata Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 (Tabel 3) adalah $8,43 \pm 0,37$ ng/ml dan pada non DM $0,84 \pm 0,20$ ng/ml. Kadar rata rata Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 lebih tinggi dibandingkan dengan non DM. Pada Gambar 1 terlihat bahwa terdapat hubungan kadar glukosa darah puasa dengan kadar Hs-CRP. Semakin tinggi kadar glukosa darah, maka semakin tinggi kadar Hs-CRP .

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian

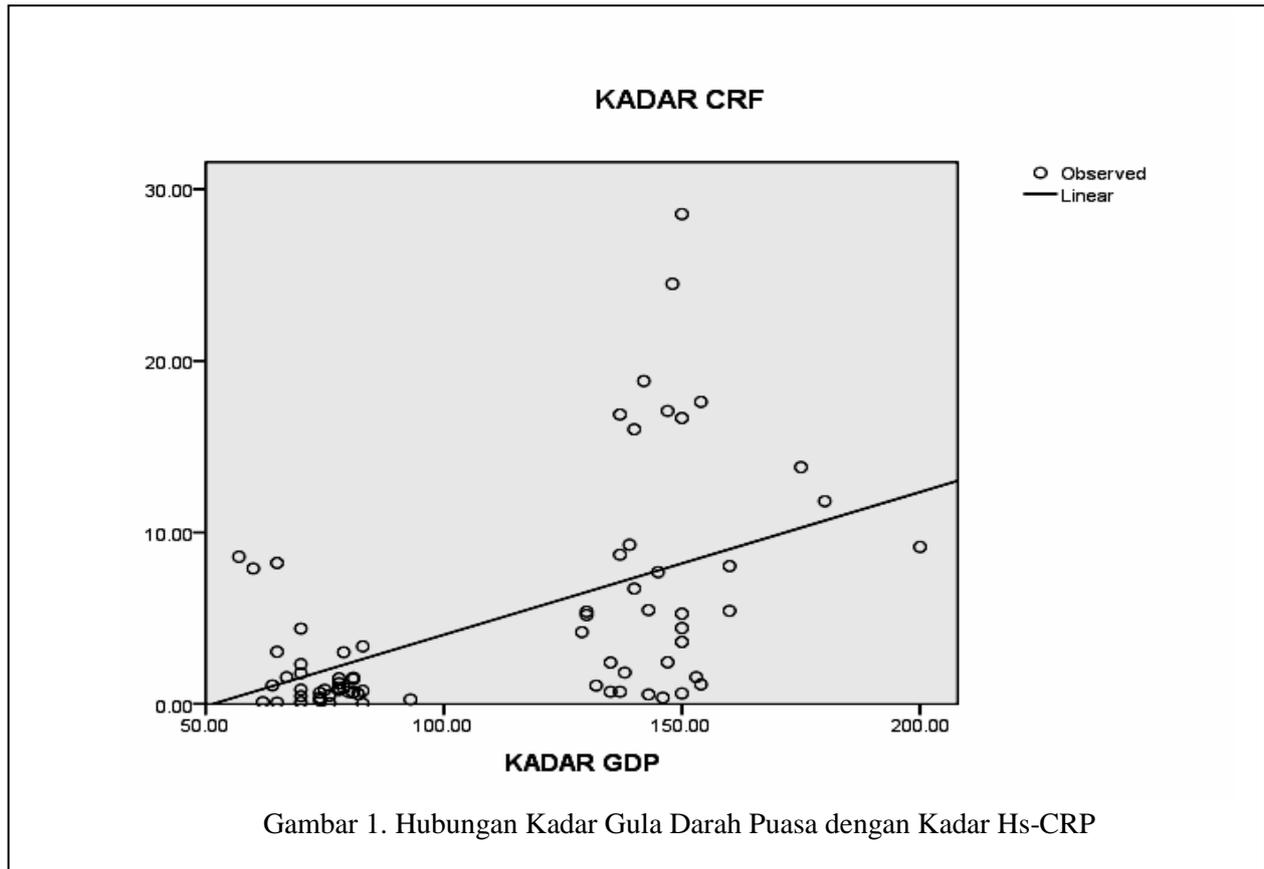
Karakteristik Subjek Penelitian	Rata- rata \pm SD		P*
	DM tipe 2	Non DM	
Umur (Tahun)	$45,31 \pm 8,53$	$30,65 \pm 6,14$	< 0,05
Glukosa darah puasa (mg/dl)	$147,31 \pm 14,57$	$74,02 \pm 7,84$	< 0,05
HbA1c (%)	$8,87 \pm 1,48$	Tidak diperiksa	
IMT	$23,79 \pm 1,63$	$20,81 \pm 1,98$	< 0,05

Tabel 2. Karakteristik Subjek Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin

Jenis kelamin	DM tipe 2	Non DM	P*
Laki laki	20 (57%)	6(17,1%)	0,001
Perempuan	15 (42,9%)	29(82,9%)	0,001
Total	35 (100%)	35 (100%)	0,001

Tabel 3. Kadar Rata- rata Hs-CRP pada Kelompok DM Tipe 2 dan Non DM

Kelompok	n	Kadar Hs-CRP (ng/ml)	P*
		Rata- rata \pm SD	
DM tipe 2	35	$8,43 \pm 0,37$	< 0,005
Non DM	35	$0,84 \pm 0,20$	< 0,005



PEMBAHASAN

Pada hasil penelitian ini kadar rata-rata Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 lebih tinggi dibandingkan dengan non DM. Peningkatan kadar Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 ini sekitar 10 kali lipat dibandingkan dengan non DM. Terjadinya peningkatan kadar rata-rata Hs-CRP pada penderita DM tipe 2 disebabkan oleh respon inflamasi yang timbul akibat komplikasi dari DM. Hal ini diawali oleh keadaan hiperglikemia intrasel menyebabkan kerusakan mitokondria pada DM tipe 2 yang mengakibatkan terjadinya peningkatan ROS dan stress oksidatif sehingga radikal bebas meningkat dalam tubuh. Peningkatan radikal bebas ini akan menyebabkan kerusakan makro dan mikrovaskuler. Mekanisme kerusakan jaringan tubuh pada DM adalah melalui *polyol pathway*, pembentukan AGEs, peningkatan aktivasi PKC, melalui peningkatan DAG, dan

*hexosamine pathway*³. Hiperglikemia intrasel menyebabkan peningkatan sintesis DAG yang menyebabkan ekspresi PKC dalam sel juga meningkat, hal ini pada akhirnya akan mengubah berbagai macam ekspresi gen yang secara keseluruhan merusak pembuluh darah. Peningkatan aktivasi PKC mengakibatkan peningkatan NF- κ B yang merupakan *Proinflammatory gene expresion* sehingga akan meningkatkan faktor-faktor inflamasi antara lain IL-6 dan TNF alpha yang akan memacu hepar memproduksi CRP.^{3,8,11}

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelainan vaskuler terjadi karena adanya *low grade chronic inflammation* pada endotelium. Keadaan tersebut diperkuat dengan peningkatan beberapa marker inflamasi khronis seperti IL-6 dan Hs-CRP. Penelitian menunjukkan bahwa Hs-CRP merupakan marker yang cukup sensitif untuk mendeteksi adanya inflamasi subklinis tersebut^{9,10,11}. Pada

non DM sebagai kontrol mekanisme kerusakan seperti yang dijelaskan diatas tidak terjadi sehingga kadar rata rata Hs-CRP lebih rendah dibandingkan dengan penderita DM tipe 2.

Berdasarkan gambar 1 terlihat bahwa semakin meningkat kadar glukosa darah, maka terjadi pula peningkatan kadar Hs-CRP. Hubungan ini memperjelas bahwa keadaan hiperglikemia akan menimbulkan kerusakan seluruh jaringan tubuh dan mempengaruhi respon inflamasi kronis seperti Hs-CRP.

SIMPULAN

Hiperglikemia pada penderita DM Tipe 2 meningkatkan kadar Hs-CRP, yang berbeda secara signifikan dengan yang terdapat pada non DM. Glukosa darah puasa berkorelasi dengan kadar Hs-CRP pada penderita DM Tipe 2.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Diabetes Federation. Global Guideline for Type 2 Diabetes. Belgium: International Diabetes Federation; 2012.
2. Perkeni. Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe II di Indonesia. 2011.
3. Brownlee M. The Pathology of diabetic complication, A unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-1625
4. Jakus V. The Role of Free Radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetica vascular disease. *Bratisl Lek Listy*. 2000; 101(10):541-551
5. Evans JL, Goldfilne ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002;23(5):599-622
6. Mohora M, Greabu M, Muscurel C, Duta C, Totan A. The Sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications, *Rom J Biophys*. 2007;17(2):63-84
7. Giacco F and Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-1070
8. Kashigawi A. Complications of Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Japan Med Assoc J*. 2001;44(12):521-528
9. Duh, Elia and Aiello LP. Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetes, the Agonist versus Antagonist Paradox. *Diabetes*. 1999;48(10):1899-1906
10. Ferrara N, and Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25
11. Choudhary N, Ahlawat RS. Interleukin-6 and C-Reactive Protein in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy New Evidence Linking Inflammation, Glycemic Control, and microalbuminuria. *Iran J Kidney Dis*. 2008;2(2):72-79
12. Piconi L, and Ceriello A. Oxidative stress, diabetes and its complications. Report. USA: Warwick Medical School;2007.

REAKTIVITAS PANEL ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP VIRUS FLU BURUNG SUBTIPE H5N1 YANG BERSIRKULASI DI INDONESIA

Emas Qurnianingsih^{1,2}, Kadek Rachmawati^{2,3}, Reviany V.Nidom², Rahmalia D.Suindari²,
Suhartati¹, Chairul A Nidom^{2,3}

¹Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, ²Avian Influenza Research Center Universitas Airlangga, ³Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

E-mail: emaqurnia@gmail.com & nidomca@unair.ac.id

ABSTRAK

Latar Belakang: Virus *Highly pathogenic avian influenza* (HPAI) sub tipe H5N1 saat ini telah menjadi enzootik di beberapa negara dan terus-menerus menyebabkan kejadian luar biasa (KLB) di hewan ternak unggas dan secara sporadik menginfeksi manusia. Meskipun Indonesia lebih rendah jumlah kasus dibanding Mesir, 197 dengan 203, tetapi jumlah kematian manusia di Indonesia tertinggi di dunia, sebanyak 165 orang dibanding 72 orang Mesir. Penularan dari unggas masih merupakan hipotesis utama dari timbulnya infeksi virus H5N1 pada manusia. Sebaliknya penerapan kebijakan vaksinasi pada unggas secara masif termasuk di Indonesia diduga menyebabkan virus H5N1 masih bersirkulasi tanpa adanya gejala kesakitan dan kematian yang jelas pada ternak unggas. Oleh karenanya pemantauan terhadap virus H5N1 yang bersirkulasi pada unggas domestik dengan menggunakan panel antibodi monoklonal yang spesifik terhadap virus H5N1 merupakan cara penting dan efisien. Penelitian dengan tujuan menguji dari suatu panel antibodi monoklonal terhadap virus H5N1 di Indonesia telah dilakukan.

Metode: Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak dengan 26 panel antibodi monoklonal yang spesifik terhadap protein hemagglutinin (HA) virus H5N1. Antibodi diujikan pada protein HA rekombinan virus H5N1 isolat ayam yang bersirkulasi di Indonesia (C1787T), sebagai pembandingan diuji pada virus homolog (WZ83) yang digunakan untuk memproduksi panel antibodi monoklonal tersebut. Uji reaktivitas menggunakan metode ELISA dan hasil uji dianalisis dengan Anova.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh panel antibodi monoklonal yang digunakan pada penelitian ini memiliki reaktivitas terhadap virus H5N1 isolat ayam di Indonesia melalui uji ELISA (n=26) dan tidak memiliki perbedaan bermakna dengan hasil ELISA pada virus homolog (WZ83) (p>0.05).

Simpulan: Panel antibodi monoklonal yang diujikan pada penelitian ini dapat menjadi alat diagnostik dalam memantau sirkulasi virus H5N1 di Indonesia.

Kata kunci: antibodi monoklonal, virus H5N1, ELISA

PENDAHULUAN

Virus *Highly pathogenic avian influenza* (HPAI) strain H5N1 saat ini menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas utama pada populasi hewan ternak unggas di

berbagai negara Asia, Eropa dan Amerika.¹ Sejak terjadinya *re-emergence* H5N1 pada tahun 2003, virus ini telah menjadi enzootik di beberapa negara dan terus-menerus menyebabkan kejadian luar biasa (KLB) pada hewan ternak unggas dan secara sporadik

menginfeksi manusia.¹ Data dari WHO menyebutkan sampai dengan Januari 2015, Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah kasus infeksi H5N1 pada manusia terbanyak. Indonesia menempati posisi kedua setelah Mesir dengan jumlah kasus yang telah dikonfirmasi sebanyak 197 orang dengan 165 orang meninggal dunia. Dibandingkan dengan Mesir, angka kefatalan kasus di Indonesia adalah tertinggi (> 80%).² Terdapat kekhawatiran jika virus H5N1 mengalami mutasi atau membentuk *reassortant* dengan virus influenza manusia, virus ini dapat memiliki kapasitas dalam penularan antar manusia.³

Saat ini pada beberapa negara termasuk Indonesia, virus H5N1 masih bersirkulasi tanpa menimbulkan mortalitas yang tinggi pada unggas domestik. Kuat dugaan hal ini disebabkan penerapan kebijakan vaksinasi pada hewan ternak unggas secara besar-besaran.¹ Di beberapa negara dengan kejadian endemis virus H5N1 pada hewan ternak unggas, virus ini terus menerus ber-evolusi sehingga mengubah antigenisitasnya dan mempengaruhi daya proteksi silang vaksin yang sedang digunakan.¹ Kasus infeksi H5N1 pada manusia merupakan kejadian yang sporadis dan jarang terjadi, namun kasus ini terjadi pada negara-negara dengan kasus enzootik virus H5N1.¹ Virus H5N1 yang diisolasi dari kasus manusia di Indonesia memiliki karakter molekuler yang berasal dari ayam (*avian origin*).⁴ Dengan demikian pemantauan rutin terhadap evolusi virus di negara-negara yang memiliki peternakan unggas perlu ditekankan.

Salah satu metode pemantauan yang digunakan adalah tes penapisan (*rapid test*). Antibodi monoklonal pada penapisan (*rapid test*) influenza ini umumnya merupakan

antibodi monoklonal yang spesifik terhadap protein M dan NP yang *conserved* diantara virus influenza. Antibodi monoklonal ini hanya mampu membedakan tipe virus influenza saja.⁵ Untuk membedakan subtipe digunakan metode RT PCR terhadap gen HA dan NA sekaligus juga untuk diagnosis pasti infeksi H5N1 bersama dengan kultur dan isolasi virus pada sel *Madine Darby Canine Kidney* (MDCK) ataupun pada telur ayam berembrio.⁶ Kedua metode ini memerlukan waktu yang relatif lama dan *skill* tertentu. Oleh karena itu, keberadaan metode diagnostik yang lebih cepat dan spesifik terhadap virus flu burung subtipe H5N1 merupakan suatu kebutuhan dan sangat penting. Penelitian bertujuan untuk menguji suatu panel antibodi monoklonal yang telah dikonstruksi dan diproduksi pada penelitian sebelumnya terhadap virus H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia. Dengan adanya hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam pemantauan sirkulasi virus flu burung subtipe H5N1 di Indonesia.

METODE

Virus

Virus yang digunakan untuk menguji panel antibodi monoklonal adalah virus flu burung subtipe H5N1 yang diisolasi dari spesies unggas ayam di Indonesia tahun 2012 (C1787T). Virus ini di propagasi terlebih dahulu dalam telur ayam berembrio (TAB) usia 9 hari dengan volume 100 µl virus / TAB pada amnion dan diinkubasikan pada suhu 37°C. Embrio yang mengalami kematian, TAB diletakkan pada suhu 4°C semalam lalu dipanen dan diambil cairan amnion dan di sentrifugasi 3000 RPM 5 menit dan selanjutnya diinaktivasi dengan 0,1-0,2 % formalin v/v. Pengerjaan prosedur ini dilakukan di dalam fasilitas ABSL-3 Avian Influenza Research center (AIRC) Universitas

Airlangga. Untuk mengetahui titer virus dapat dilakukan uji Hemaglutinasi (HA).⁶

Produksi Protein Hemaglutinin (HA)

Rekombinan

Produksi protein HA rekombinan virus H5N1 C1787T mengikuti prosedur kloning dan transformasi standar untuk bakteri, seperti pada penelitian sebelumnya. Demikian pula pemurnian plasmid menggunakan protokol *midi preps kits* sesuai dengan protokol perusahaan penyedia reagen (Marligen Biosciences, Rockfille, USA), transfeksi dengan TransIT-LT1 *transfection reagent* (Mirus, USA) dan ekstraksi dengan *Mem-PER Eukaryotic membrane protein extraction reagent kit* (Pierce, Rockford, USA).

ELISA

Protein rekombinan hemaglutinin virus H5N1 isolat ayam C1787T digunakan sebagai antigen. *Plate ELISA Nunc Maxisorb*[®] microtitre plates (VWR International, Darmstadt, Germany) dilapisi dengan antigen tersebut dengan pengenceran 2000x dalam PBS dan diinkubasi pada 4⁰ C selama semalam. Setelah membuang kelebihan antigen, *plate* kemudian dicuci dengan 0.05 % PBST. *Plate* selanjutnya di blok menggunakan 3% skim milk dalam PBS. Antibodi monoklonal terhadap hemaglutinin H5N1 yang telah diencerkan 2000x dalam 1 % skim milk-PBST, selanjutnya ditambahkan pada tiap *well plate* ELISA dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 1 jam dan selanjutnya dicuci 3x dengan 0,05 % PBST. Antibodi sekunder terdiri dari HRP-goat anti mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA), HRP-goat anti mouse IgA (α) -(KPL,goatanti Mar mouse IgM (μ) (KPL, Maryland, USA) kemudian ditambahkan pada tiap *well* dan diinkubasikan pada suhu ruang

selama 1 jam dan dicuci dengan 0,05 % PBST 3 kali. Larutan 3.3',-tetramethylbenzidine5.5' (TMB) (Sigma, Missouri, USA) kemudian ditambahkan dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 15-30 menit. *Optical density* kemudian dibaca menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm⁷.

HASIL

Uji ELISA memberikan data sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil uji ELISA panel antibodi monoklonal terhadap virus H5N1 isolat ayam (C1787T) di Indonesia tahun 2012

Antibodi Monoklonal	rHA C1787T	rHA WZ83
26-1	0,068	0,572
36-4	0,082	0,89
42-2	0,067	1,05
59-6	0,062	0,298
82-4	2,64	0,881
85-1	0,069	0,465
95-8	0,066	3,024
99-10	0,313	2,47
102-1	0,892	0,277
103-4	0,9	0,462
104-7	0,414	2,938
105-11	0,072	0,569
108-1	0,255	0,803
119-12	0,121	0,609
148-11	0,068	1.012
162-5	1,452	2,66
164-13	0,062	2,881
173-11	0,157	1,569
176-4	2,715	1,626
177-3	0,065	0,047
182-3	0,352	0,04
209-1	0,069	0,039
211-3	0,576	0,042
218-1	2,767	0,055
228-3	1,819	0,057
229-10	1,915	0,051

Keterangan:

rHA C1787T: protein rekombinan hemaglutinin virus H5N1 isolat ayam yang diisolasi di Indonesia tahun 2012.

rHA WZ83: protein rekombinan hemaglutinin virus H5N1 yang digunakan untuk menghasilkan antibodi monoklonal pada penelitian ini.

Tabel 2. Hasil Analisis Statistik Univariate (Anova) Hasil Uji ELISA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21.797 ^a	26	.838	.806	.706
Intercept	36.565	1	36.565	35.163	.000
antibodimonoklonal	20.758	25	.830	.798	.711
Rekombinan	1.039	1	1.039	.999	.327
Error	25.997	25	1.040		
Total	84.359	52			
Corrected Total	47.794	51			

a. R Squared = .456 (Adjusted R Squared = -.110)

PEMBAHASAN

Propagasi virus

Propagasi atau inokulasi virus influenza merupakan suatu tehnik standar yang sangat bermanfaat untuk diagnosis infeksi virus bila menggunakan spesimen klinis dengan kualitas baik. Inokulasi virus influenza pada telur ayam berembrio (TAB) atau dengan kultur sel bersamaan dengan tehnik identifikasi virus melalui metode imunologi atau metode genetik (misalnya dengan metode PCR) merupakan metode standar untuk diagnosis virus influenza.⁶ Untuk kasus infeksi virus H5N1, meskipun gejala awal infeksi H5N1 pada manusia memiliki spektrum luas dan dapat bersifat tidak khas yakni dari asimtomatis atau gejala seperti influenza biasa yang ringan hingga ke pneumonia berat sampai pada kegagalan berbagai organ, timbulnya gejala pada saluran cerna dan kelainan darah.⁸ Adanya infeksi H5N1 patut dicurigai pada pasien bila pasien tersebut berasal dari tempat dimana terjadi kejadian luar biasa infeksi H5N1 pada ayam ternak ataupun burung. Kecurigaan terhadap infeksi H5N1 pun patut dipertimbangkan bila terdapat riwayat kontak dengan produk hewan yang terkontaminasi atau mati karena sakit. Akan tetapi, dengan adanya penerapan kebijakan vaksin di peternakan membuat infeksi H5N1 pada ayam dan unggas lain

menjadi asimtomatis dan ini tidak menyingkirkan kecurigaan terhadap infeksi H5N1.¹ Salah satu tujuan inokulasi virus untuk menghasilkan virus dengan jumlah banyak yang dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya, seperti karakterisasi genoma dan suatu antigen serta untuk penyiapan suatu vaksin atau uji kepekaan obat bila diperlukan.⁶

Virus influenza dari inang burung (avian) dapat tumbuh sangat baik pada telur ayam berembrio. Virus influenza yang berasal dari inang mamalia tidak dapat tumbuh dengan baik pada telur ayam berembrio, tetapi dapat tumbuh baik pada kultur sel.⁶ Virus H5N1 isolat avian dapat juga ditumbuhkan pada bagian amnion dari TAB karena bagian ini memiliki reseptor asam sialat $\alpha 2,6$, akan tetapi hasil berikutnya. oleh karenanya pada propagasi virus H5N1 isolat mamalia, kultur sel MDCK masih memegang peran yang penting.⁹

Virus influenza subtipe H5N1 merupakan virus influenza yang lazim ditemukan pada spesies burung (*avian origin*). Fenomena di beberapa negara termasuk di Indonesia bahwa virus H5N1 yang diisolasi dari inang mamalia termasuk dari manusia masih memiliki karakter molekuler yang homolog dengan virus H5N1 yang diisolasi dari ayam.⁴ Pada penelitian ini, virus H5N1

yang digunakan untuk melakukan pengujian panel antibodi monoklonal berasal dari virus H5N1 yang diisolasi dari ayam di daerah endemik virus H5N1. Oleh karena itu metode inokulasi yang digunakan pada penelitian ini tetap dengan menggunakan telur ayam berembrio (TAB).¹⁰

Salah satu tolok ukur keberhasilan inokulasi virus H5N1 pada TAB bila terjadi kematian pada embrio.⁶ Telur yang mengalami kematian embrio tersebut, selanjutnya dilakukan pemanenan virus melalui pengambilan cairan alantoisnya setelah sebelumnya disimpan pada suhu 4°C. Virus H5N1 merupakan virus yang memiliki patogenisitas tinggi sehingga akan terjadi kematian embrio kurang dari tiga hari atau 32 jam, rata-rata dua hari. Semakin patogen virusnya, maka akan didapatkan kematian yang lebih cepat dan dapat menghalangi proses replikasi virus selanjutnya. Dengan demikian propagasi virus H5N1 membutuhkan jumlah TAB yang besar agar didapatkan titer virus yang tinggi. Meskipun inokulasi pada TAB dapat tidak berhasil dikarenakan adanya kontaminasi bakteri namun dengan penggunaan TAB yang specific pathogen free (SPF) dapat mengurangi resiko ini. Selain itu, propagsi atau inokulasi virus H5N1 pada TAB, akan didapatkan titer virus yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur sel *Madine Darby Canine Kidney* (MDCK).¹¹ Pengambilan cairan alantois ini bertujuan untuk mendapatkan virus H5N1 yang selanjutnya digunakan sebagai antigen pada ELISA dan uji HI pada penelitian ini.

5.3. ELISA

ELISA merupakan uji serologis yang mendeteksi antigen /antibodi terhadap virus influenza A. Kit ELISA komersial untuk pengujian penyakit influenza yang telah

tersedia merupakan kit ELISA untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap protein nukleoprotein (NP). Demikian pula kit ELISA yang digunakan mendeteksi keberadaan antigen virus ini, umumnya menggunakan panel antibodi monoklonal, terhadap protein matriks (M) atau nukleoprotein (NP). Kedua jenis protein ini merupakan protein yang memiliki urutan asam amino yang *conserved* di antara semua subtipe virus influenza A. Dengan demikian, mengalami kesulitan dalam interpretasi hasil, karena tidak dapat membedakan subtipenya. Oleh karenanya hasil yang positif pada uji ini, harus dilanjutkan dengan uji HI untuk menetapkan subtipe HA nya, seperti untuk membedakan H5 atau H7.¹²

Cina dan negara disekitarnya, merupakan negara yang memiliki laporan jumlah subtipe virus Influenza yang lebih banyak dari negara lain, sehingga pemantauan virus yang berkembang dan muncul di negara tersebut, bisa menjadi awal penyebaran baik melalui burung migrasi maupun sarana lainnya. Keadaan ini menjadikan virus Influenza yang baru dari dari negara-negara tersebut menjadi penting. Salah satu di antaranya virus WZ83 (A/duck/Hokkaido/2010 (H5N1) yang tergolong dalam *clade 2.2*.

Panel antibodi monoklonal yang telah diproduksi merupakan panel antibodi monoklonal yang spesifik terhadap protein HA virus influenza A subtipe H5N1 tersebut. Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap HA yang berasal dari virus H5N1 dengan *clade* yang berbeda telah banyak dilakukan dalam penelitian untuk memantau sirkulasi virus H5N1 yang ada di lapangan terutama di Asia Tenggara.^{13,14}

Uji ELISA yang digunakan pada penelitian ini merupakan uji ELISA dengan

metode *indirect* (tidak langsung). Uji ELISA pada penelitian dilakukan untuk mengetahui reaktivitasnya terhadap virus H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia.

Pada penelitian ini, panel antibodi monoklonal diuji terhadap virus H5N1 isolat ayam Indonesia C1787T (*clade* 2.1.3.) dan dibandingkan dengan virus homolog (WZ 83). Meskipun *clade* virus yang digunakan untuk menghasilkan antibodi monoklonal berbeda, namun dari hasil ELISA panel Mab masih dapat mengenali virus yang diuji. Ini ditunjukkan dengan hasil analisis menggunakan Anova yang menyebutkan bahwa panel antibodi monoklonal dapat bereaksi baik terhadap virus homolog maupun terhadap virus yang beredar di Indonesia. Hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan oleh karena $p > 0.05$. Hal ini menunjukkan antibodi monoklonal ini mengenali epitope yang *conserved* dari protein HA sehingga mampu mengenali virus influenza A subtype H5 dari berbagai *clade* yang berbeda dan dapat digunakan sebagai alat diagnostik maupun monitoring sirkulasi virus H5N1 di Indonesia.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa panel antibodi monoklonal yang diujikan dapat mengenali / bereaksi terhadap virus H5N1 isolat ayam yang bersirkulasi di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada Universitas Airlangga melalui program penelitian Hibah Riset Universitas Airlangga tahun 2014 atas dukungan finansial dalam penyelenggaraan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). Current evolution of avian influenza H5N1 viruses. Geneva: World Health Organization. 2011 September 7 [Diakses pada 21 November 2011]. Dari situs: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/tripartite_notes_H5N1.pdf.
2. World Health Organization (WHO). Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2015. Geneva: World Health Organization, 26 Januari 2015, posting date. [Diakses pada 28 Februari 2015]. Dari situs: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150126CumulativeNumberH5N1cases.pdf.
3. Zheng, Q., Xia L, Wu WL, Zheng Z, Huo Y, Wu J et al. Properties and therapeutic Efficacy of broadly reactive chimeric and humanized H5-specific monoclonal antibodies against H5N1 Influenza Viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1349-1357
4. Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, Yusharmen, Hadisoedarno W, Purba W dkk. Three Indonesian clusters of H5N1 virus infections in 2005. *N Engl J Med* 2006;355;2186-94
5. Hurt A C, Alexander R, Hibbert J, Deeda N, Barr I G. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol*. 2007;39;132-135
6. World Health Organization (WHO). WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Geneva: WHO Global Influenza Programme; 2002.
7. Kida H, Brown LE, Webster RG. Biological Activity of Monoclonal Antibodies to Operationally Defined Antigenic Regions on Hemagglutinin molecule of A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) Influenza Virus. *Virology* 1982;122(1);38-47
8. Hui DSC. Review of Clinical Symptoms and Spectrum in Human With Influenza A/H5N1 Infections. *Respirology* 2008;13(suppl);S10-

13

9. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M et al. In vitro and in vivo characterization of new swine origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009;460:1021-1025
10. Suarez DL. Avian Influenza. Iowa: Blackweel Publishing Professional. 2008
11. Wanasawaeng W, Bunpapong N, Thanawongnuwech R. Growth Characteristics of the Thai H5N1 Avian Influenza Virus in Chicken Embryonic Eggs and MDCK Cells. Proceedings, The 15th Congress of FAVA 27-30 October 2008. FAVA - OIE Joint Symposium on Emerging Diseases
12. World Organisation For Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 2.3.4. Avian Influenza. 2014. www.oie.int
13. Masalova OV, Klimova RR, Chichev EV, Fediakina IT, Loginova SY, Borisevich SV, Bondarev VP, Deryabin PG, Lvov DV, Kushch AA. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. *Acta virologica* 2011;3 –14
14. Kajihara M, Matsuno K; Simulundu E, Muramatsu M, Noyori O, Manzoor R, Nakayama E, Igarashi M, Tomabechi D, Yoshida R, Okamatsu M, Sakoda Y, Ito K, Kida H, Takada A. An H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus That Invaded Japan Through Waterfowl Migration. *Jpn J Vet Res.* 2011 Aug;59(2-3):89-100

EFEK EKSTRAK DAUN TORBANGUN (*Coleus amboinicus* Lour) SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA HATI TIKUS DIABETES

Trini Suryowati¹, Rimbawan², Rizal Damanik², Maria Bintang³, Ekowati Handharyani⁴

¹Departemen Biokimia FK UKI Jakarta 13630, Indonesia. ²Departemen GMSK FEMA IPB Bogor 16680, Indonesia, ³Departemen Biokimia FMIPA IPB Bogor 16680, Indonesia. ⁴Devisi Patologi FKH IPB Bogor 16680, Indonesia

E-mail: trini.suryowati@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Sistem antioksidan enzimatis memegang peran penting pada pertahanan sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas oksigen selama proses metabolisme. Enzim-enzim tersebut menjaga jaringan dari aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stres oksidatif pemicu komplikasi pada keadaan diabetes. *Coleus amboinicus* Lour, dikenal dengan nama torbangun, telah dipakai untuk meningkatkan produksi ASI oleh suku Batak. Pengaruh aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun *Coleus amboinicus* Lour pada stres oksidatif tikus diabetes.

Metode: Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus jantan galur *Spargue dawley* yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif dan empat kelompok tikus diabetes diberi perlakuan. Pemberian oral ekstrak dengan dicekok. Kelompok kontrol positif dan negatif dicekok akuades, kelompok perlakuan dicekok ekstrak etanol daun torbangun dengan dosis 620 mg/kg BB dan 930 mg/kg BB; metformin 62.5 mg/kg BB; kuersetin 15 mg/kg BB tikus diabetes tipe 2 yang telah induksi streptozotocin selama 14 hari. Kadar glukosa darah ditentukan dengan Accu-Chek Active, SOD, katalase dan GPx dengan kit.

Hasil: Efek ekstrak etanol daun *Coleus amboinicus* Lour menunjukkan kecenderungan menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan antioksidan enzimatis katalase pada tikus diabetes ($p < 0.05$). Aktivitas antioksidan kuersetin dalam daun ekstrak etanol dapat berperan sebagai antihiperглиkemia pada tikus diabetes tipe 2.

Kesimpulan: Ekstrak etanol daun *Coleus amboinicus* Lour dapat menurunkan kadar glukosa darah dan menaikkan enzim katalase.

Kata kunci : Antioksidan, Oksidatif stres, torbangun (*Coleus amboinicus* Lour).

PENDAHULUAN

Penelitian epidemiologi telah melaporkan bahwa tingginya konsumsi sayuran dan buah berbanding terbalik dengan resiko penyakit kronis seperti penyakit jantung, asma, diabetes, kegemukan dan kanker, karena antioksidan non enzimatis banyak ditemukan dalamnya.¹ Pembentukan radikal bebas endogen dan eksogen dapat menyebabkan kerusakan sel

modifikasi molekul termasuk DNA, membran lipid, protein. Perlindungan dari antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathionn peroksidase sangat diharapkan agar tidak terjadi kerusakan sel yang berkelanjutan.² Antioksidan kuersetin yang terdapat dalam sayuran atau buah dilaporkan berpotensi menangkal radikal bebas. Potensi tersebut ditunjukkan dengan adanya gugus hidroksil pada cincin B dan C,

dan dapat menangkal radikal hidroksil, peroksil dan anion superoksida.³

Diabetes Melitus (DM) berasal dari bahasa Latin diabetes berarti pancuran dan melitus berarti madu merupakan suatu sindrom metabolisme dalam tubuh yang ditandai dengan timbulnya hiperglikemia akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang mempercepat pembentukan radikal bebas. Reaksi molekuler yang terjadi di beberapa jaringan mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Radikal bebas tersebut menyebabkan stres oksidatif dan ditandai dengan peningkatan kadar malon dialdehyde (MDA) sebagai indikator terjadinya penurunan kadar antioksidan enzimatis dalam tubuh.⁴

Daun torbangun telah dipakai untuk meningkatkan air susu ibu pada suku Batak⁵ dan pengobatan tradisional pada alergi kulit, diare, demam dan hepar.⁶ Ekstrak daun torbangun berperan sebagai agent hipoglikemia dengan memperbaiki kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan meningkatkan konsentrasi kalsium intraseluler pada tikus. Mekanisme tersebut melalui sekresi insulin dan enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme glukosa.⁷ Namun masih diperlukan bukti-bukti ilmiah tentang peran dan mekanisme kerja bahan aktifnya, dalam menunjang kesehatan.⁸ Efek hipoglikemik pada tikus DM yang diinduksi alloksan, karena terdapat komponen aktif dari poliphenols sebagai antioksidan diantaranya alkaloids, terpenoids, glikosida, saponin.⁹ Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun torbangun (*Coleus amboinicus* Lour) sebagai antioksidan non enzimatis pada hati tikus diabetes.

METODE

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Hewan Coba

Hewan coba adalah 30 ekor tikus jantan dengan galur *Sprague-dawley* yang berumur 8 minggu dengan kisaran berat badan 200 ± 10 g diperoleh dari BPOM Jakarta. Masing-masing dua ekor tikus dalam satu kandang dengan kondisi: ventilasi dalam kandang cukup, suhu udara pada suhu kamar (31- 32°C), dan cahaya terkontrol dengan siklus 12 jam siang, 12 jam malam dan diberikan pakan standar serta minum secara *ad libitum*.

Persiapan Bahan dan Alat

Daun torbangun didapat dari tanaman di daerah Cibereum Bogor, dipetik yang berwarna hijau segar 4-5 helai daun bagian atas setelah umur 2 bulan. Dicuci 3 kali dengan air dan dibilas dengan *aquadest*, dikeringkan sebelum dilakukan maserasi.

Streptozotocin (STZ-Sigma, Jerman), metformin, *quercetin*, ketamin, xylazin, larutan buffer neutraformalin (BNF) 10%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, xilol, parafin, *aquadest*, pewarna hematoksilin-eosin (HE), pewarna imunohistokimia, fosphat buffer saline (PBS) pH 7.4, Dako-pen marker, antibodi terhadap Insulin dan 1-3, diaminobenzidin (DAB), *aquadest*, bahan-bahan kimia analisis.

Peralatan yang digunakan adalah spoit, kandang tikus dan peralatannya, peralatan bedah, tissue cassette, inkubator, tissue processor, mikrotom, object glass, cover glass, digital blood glucose meter dan mikroskop, timbangan, micropipet, alat-alat analisis, Spektrofotometri.

Persiapan Tikus Diabetes

Tikus model diabetes disiapkan dengan cara tikus puasa selama semalam, kemudian diinduksi dengan Streptozotocin (STZ) secara intraperitoneal dengan dosis tunggal sebesar 50 mg/kg BB yang dilarutkan dalam 1 mL *aquadest* dan diasamkan dengan 0,01 M buffer sitrat dingin (pH : 4,5). Keberhasilan induksi ditentukan dengan mengukur glukosa darah pada hari ke-2 setelah pemberian STZ. Pada hari pertama tikus di induksi STZ diberi glukosa 5% selama 1 hari untuk menghindari efek hipoglikemia. Pasca induksi STZ setelah 3 hari, tikus diabetes dibagi secara random, dengan pertimbangan yang glukosa darah tinggi dipisahkan tersendiri untuk menjaga terjadi koma adisis. Pemberian suspensi ekstrak daun torbangun secara oral, menggunakan sonde lambung pada tikus dengan dosis 620 mg/kg BB dan 930 mg/kg BB selama 14 hari.¹⁰

Perlakuan Pada Hewan Coba Diabetes

Sejumlah 30 ekor tikus jantan diletakkan masing-masing satu ekor dalam satu kandang dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok perlakuan diwakili oleh 5 ekor tikus. Pada kelompok 1 (normal) dan 2 (diabetes) masing-masing menerima *aquadest* steril 5 ml/kg BB. Kelompok 3 (diabetes) dicekok ekstrak daun torbangun dosis 620 mg/kg BB dan kelompok 4 (diabetes) dicekok ekstrak daun torbangun dosis 930 mg/kg BB. Ekstrak daun torbangun menjadi suspensi dengan cara 0.3% berat/volume NaCMC ada kelompok 3 dan 4 selama 14 hari setiap pukul 08.00 - 09.00 WIB.⁷ Kelompok 5 (diabetes) dicekok Metformin dengan dosis 62.5 mg/kg BB selama 14 hari.¹¹ Kelompok 6 (diabetes) dicekok kuersetin dengan dosis 15 mg/kg BB.¹²

Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dengan menggunakan glukometer (*accu check*) dilakukan pada hari ke- 0, 1, 4, 7, 10, 14 pasca induksi STZ. Pengukuran dilakukan pada pagi hari sebelum pemberian pakan. Sampel darah didapat dari ujung ekor tikus dan pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada semua tikus dari setiap kelompok. Hasil yang didapat dirata-ratakan untuk menggambarkan nilai kadar glukosa darah kelompok dengan satuan mg/dL. Penimbangan berat badan tikus pada hari yang sama dengan pengukuran glukosa darah tikus.⁷

Pengambilan Organ Hati

Pada akhir penelitian (hari ke-15 pasca induksi STZ) semua tikus dianestesi general dengan ketamin dan xylazine dengan dosis 35 mg/kg BB. Nekropsi dilakukan dengan menyayat kulit dan otot abdominal hingga rongga perut terbuka. Darah tikus dikeluarkan hingga detak jantung terhenti dan selanjutnya dilakukan pengambilan organ hati. Organ dibuat homogen (5% berat/volume) dengan larutan buffer K₂PO₄ (50 mM, pH 7.4), menggunakan alat homogeniser. Kemudian disentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit, didapat supernatan. Selanjutnya supernatan akan dianalisis kadar katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), asam thiobarbiturat reaktive substans (TBARS)¹³.

Analisis Data

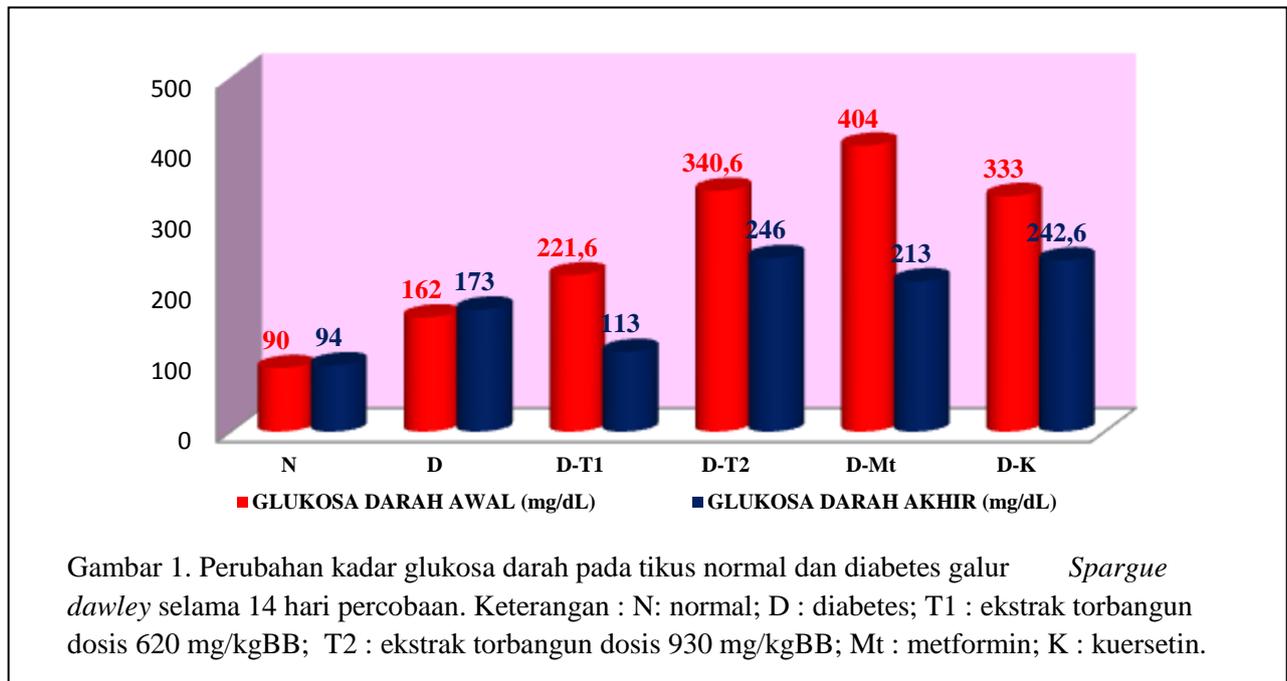
Analisis statistik menggunakan program Microsoft Excel 2007 dan SPSS versi 15. Data hasil pengukuran parameter yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) pada selang kepercayaan 95% untuk melihat ada tidaknya pengaruh perlakuan, apabila terdapat keragaman dilanjutkan dengan uji beda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktifitas hipoglikemik ekstrak daun torbangun pada tikus diabetes

Hasil pengukuran glukosa darah pada hari ke 2 setelah penyuntikan STZ menunjukkan peningkatan kadar glukosa darah yang berbeda antar tikus. Tikus dinyatakan hiperglikemia bila kadar > 126 mg/dL.¹⁴ STZ dapat merusak sel beta pankreas dan menghambat ekskresi insulin ke dalam pembuluh darah. Mekanisme yang terjadi karena alkilasi DNA pankreas maka terjadi kerusakan DNA dan terjadi

penurunan ATP serta menghambat sekresi insulin.¹⁵ Kekurangan insulin akan mengakibatkan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel untuk diubah menjadi ATP, sehingga terjadi peningkatan glukoneogenesis dan menyebabkan hiperglikemia.¹⁶ Pengukuran glukosa darah dilakukan pada hari 1,4, 7, 10, 14 pasca diinjeksi STZ. Pada gambar 1 menjelaskan efek ekstrak daun torbangun (*Coleus amboinicus* Lour) pada perubahan glukosa darah tikus normal dan diabetes galur *Spargue dawley* selama 14 hari perlakuan.



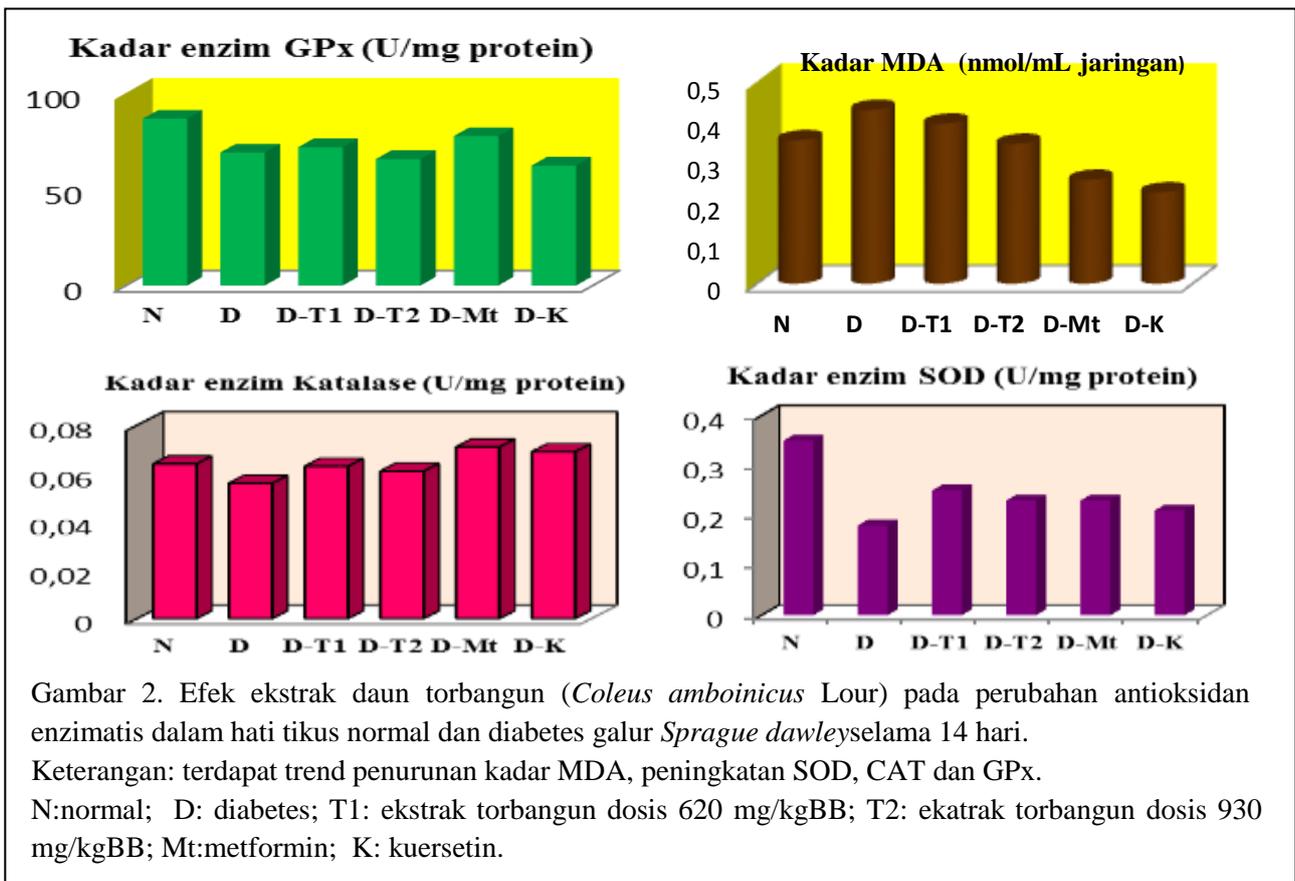
Terjadi penurunan kadar glukosa darah pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak daun torbangun dosis T1: 630 mg/kgBB, dosis T2: 930 mg/kgBB, obat metformin 62.5 mg/kgBB dan kuersetin 15 mg/kgBB. Hal ini karena gugus aktif dalam antioksidan diantaranya kuersetin, dapat menangkap radikal bebas dan menjadi tidak aktif, sehingga glukosa dapat masuk ke dalam sel dan terjadi metabolisme glikolisis.

Efek ekstrak daun torbangun pada aktivitas antioksidan enzimatis di hati tikus diabetes

Analisis antioksidan enzimatis dilakukan pada hati tikus normal dan diabetes diantaranya superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion pereduksi (GPx). Terdapat penurunan kadar enzim-enzim tersebut pada tikus diabetes, setelah 14 hari perlakuan. Pada tikus diabetes terjadi stres oksidatif dan ditunjukkan dengan peningkatan produksi H₂O₂ dan perubahan kadar antioksidan enzimatis. Pada tikus diabetes yang dicekok ekstrak daun torbangun terjadi peningkatan kadar antioksidan enzimatis dan

penurunan glukosa darah, hal ini menunjukkan mekanisme kontrol kadar glukosa darah. Enzim SOD mengkatalisis reaksi dismutasi radikal superoksida, dan katalase adalah haemoprotein yang mengkatalisis reaksi reduksi menjadi H₂O serta menjaga jaringan dari radikal hidroksil. Enzim glutathion pereduksi yang mengandung Se berperan pada reaksi oksidasi dan reduksi perubahan H₂O₂ menjadi H₂O. Kadar malondialdehida (MDA) meningkat pada hati tikus diabetes, hal ini menjelaskan bahwa

terjadi stres oksidatif. Sedangkan pada tikus diabetes yang dicekok ekstrak daun torbangun terjadi penurunan kadar MDA, hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak daun tersebut mengandung antioksidan kuersetin berperan sebagai pengontrol radikal bebas.¹² Efek ekstrak daun torbangun meningkatkan aktivitas antioksidan enzimatis serta menurunkan kadar malondialdehid dalam hati tikus normal dan diabetes terdapat pada gambar 2.



SIMPULAN

Ekstrak daun torbangun (*Coleus amboinicus* Lour) dapat menurunkan kadar glukosa darah, radikal bebas dan meningkatkan aktivitas antioksidan enzimatis pada hati tikus diabetes induksi STZ.

DAFTAR PUSTAKA

1. Barth SW, Faehndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G. Cloudy applejuice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*. 2005;26:1414–1421.
2. Oszmianski J, Wolniak M, Wojdyło A, Wawer I. Comparative study of polyphenolic content

- and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *J Sci Food Agric*. 2007;87:573–579.
3. Gerhauser C . Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* 2008;74:1608–1624.
 4. Jameson, Larry J. *Harrison's Endocrinology*. 2nd edition. The McGraw Companies, Inc. Section III. 2010;267-313.
 5. Damanik R. Torbangun (*Coleus amboinicus* Lour): A Batakese Traditional Cuisine Perceived as Lactagogue by Batakese Lactating Women in Simalungun, North Sumatera, Indonesia. *Journal of Human Lactation*. 2009;25:64-72.
 6. Luckoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J Ethnopharmacol*. 2006 Jan; 3;103(1):1-24.
 7. Viswanathaswamy AHM, Koti BC, Gore A, Thippeswamy AHM and Kulkarni RV. Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Activity of *Plectranthus Amboinicus* on Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. *Indian J Pharm Sci*. 2011 Mar;73(2):139-145.
 8. Santosa CM dan Triana H. Kandungan senyawa kimia dan efek ekstrak air Daun Bangun-bangun (*Coleus amboinicus*, L.) pada aktivitas fagositosis netrofil tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Majalah Farmasi Indonesia*, 2005;3:141 – 148.
 9. Subhas CM, Shivakumar H, Itgappa M, Nagarajappa K. Antidiabetic and antioxidant potential of *Coleus Aromaticus* leaf Extracts in Alloxan induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*. 2009; 3:1054-1061.
 10. Sachin A, Shreesh KO , Divya V. Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology* . 2009;3(2): 81-84.
 11. Shareef SM, Sridhar I, Mishra SS, Venkata Rao Y. Evaluation of hypoglycemic effect of *Lagerstroemia speciosa* (Banaba) leaf extract in Alloxan Induced Diabetes Mellitus Rabbits. *Int J Med Res Health Sci*. 2013;2(2):217-222
 12. Atef EAE. Quercetin protective action on oxidative stress, sorbitol, insulin resistance and β - cells function in experimental diabetic rats. *IJPSR*. 2011;3(2):11-18
 13. Asok KK , Umamaheswari M, Somanathan SS, Sivashanmugam AT, Subhadradevi V, Sambathkumar R. Antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Asystasia gangetica* in Streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus (NIDDM) in rats. *Journal of Pharmacy Research*. 2010;3(10):2516-2520.
 14. Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY* and Kwon O*. Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/ streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*. 2011;8:18.
 15. Krishnaveni K and Challa SR. Anti diabetic activity of *Dolichos lablab* (seeds) in Streptozotocin- Nicotinamide induced diabetic rats. *Hygeia.J.D.Med*. 2013;5(1):32-40
 16. Dehghan G, Tahmasebpou Nr, Hosseinpour MAF, Sheikhzadeh F, Banan SMK. Hypoglycemic, antioxidant and hepato- and nephroprotective effects of *Teucrium orientale* in streptozotocin diabetic rats. 2013;1:182-189. <http://pharmacologyonline.silae.it>

POLA MUTASI VIRUS FLU BURUNG H5N1 PADA BERBAGAI INANG BERDASARKAN KAJIAN MOLEKULAR FRAGMENT HEMAGGLUTININ

Kadek Rachmawati^{1,2}, Ema Qurnianingsih^{2,3}, Muhamad Y. Alamudi², Setyarina Indrasari², Soetjipto³, Chairul A. Nidom^{1,2}

¹Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan; ²Avian Influenza Research Center (AIRC); ³Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran-Universitas Airlangga

E-mail: kadekrachmawati@yahoo.co.id & nidomca@unair.ac.id

ABSTRACT

Background: Avian Influenza viruses are enveloped viruses that contain a segmented genome of eight different negative strand RNA molecules. The function of hemagglutinin (HA) protein is to recognize sialic acid-containing receptors on the cell surface. RNA viruses tend to mutate, and the type of mutation of H5N1 avian influenza virus subtype are: antigenic drift and antigenic shift. Antigenic drift caused by random mutations, mostly point mutations, antigenic shift results from gene reassortments when two different subtype viruses infect the same animal host. The purpose of this research was to analyze the pattern of mutation of H5N1 avian influenza virus in a variety of host based on molecular studies of HA fragment.

Methods: The H5N1 avian influenza virus isolated from humans (virus code D4) were infected to chickens (*Gallus sp.*), monkeys (*Macaca fascicularis*) and ferret (*Mustella putorius*). Isolate shedding virus from monkey infected to chicken. The isolates were collected from tracheal swabs (chickens), nasopharyngeal swab (monkeys), and nasalwash (ferret). Isolate shedding virus from chickens inoculated in embryonated chicken eggs, isolate shedding virus from monkeys and ferrets inoculated on MDCK cells. The allantoic fluids from embryonated chicken eggs and the supernatant of MDCK cells subjected to HA test, the positive HA test subjected to RT-PCR for HA and continued to nucleotide sequencing. The sequence of nucleotide were analyzed to predict the amino acid, and then alignment the sequence of HA amino acids from the origin viruses with shedding viruses.

Results: Poultry and mammal induced mutation on 341 cleavage site and 220-loop of receptor binding domain of HA gene.

Conclusions: Mutation of 341 cleavage site and 220-loop receptor binding domain of HA of H5N1 avian influenza virus was found from human after transmission to monkey, ferret and chicken animals model.

Keywords: H5N1 Avian Influenza virus, transmission, mutation, poultry, mammals

PENDAHULUAN

Avian Influenza atau disebut pula *fowl plaque* pertama kali dikenal sebagai penyakit infeksius pada burung yang menyerang ayam di Italia pada tahun 1878. Sejak tahun 1955 oleh Schafer diketahui bahwa penyakit yang menyerang unggas ini disebabkan oleh virus Influenza A.¹ Virus ini dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik.²

Sebelum tahun 1997 penyakit Avian Influenza atau Flu Burung masih jarang terjadi wabah di dunia, namun sejak terjadinya wabah Flu Burung di Hongkong pada tahun 1997 maka wabah tersebut mulai menyebar hampir ke seluruh negara di dunia. Bahkan akhir tahun 2003, virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika.³

Selain pada unggas, virus Avian Influenza dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Seperti kasus Flu Burung pada manusia di Hongkong yang telah menyebabkan enam orang meninggal dari 18 orang yang terinfeksi virus Avian Influenza disebabkan karena terjadi penularan virus Avian Influenza dari unggas ke manusia.⁴ Bahkan sampai dengan 26 Januari 2015 tidak kurang dari 718 orang telah dilaporkan terinfeksi virus Avian Influenza subtipe H5N1 dan 413 di antaranya meninggal dunia.⁵

Di Indonesia kasus Flu Burung pertama pada manusia terjadi di Jawa Barat dengan meninggalnya seorang bapak dengan dua anaknya. Sampai dengan 26 Januari 2015, kasus Flu Burung di Indonesia mencapai angka lebih dari 197 orang dan 165 orang diantaranya meninggal dunia. Kenyataan ini

menunjukkan bahwa korban meninggal akibat infeksi Flu Burung pada manusia di Indonesia merupakan jumlah terbanyak di dunia.⁵

Virus Influenza A mudah bermutasi, terutama pada fragmen Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA). Sampai saat ini telah diketahui terdapat 16 subtipe HA, H1 – H16 dan 9 subtipe NA, N1 – N9 yang disebabkan karena virus ini mampu mengubah diri melalui proses *antigenic drift* dan *antigenic shift*.⁶ Mutasi yang meliputi substitusi, delesi dan insersi adalah mekanisme paling penting dalam menyebabkan variasi virus influenza. Hal ini disebabkan karena enzim polimerase virus influenza (virus RNA) tidak memiliki kemampuan *proofreading* sehingga diperkirakan berperan dalam kesalahan replikasi sekitar satu basa dalam setiap 10^4 basa. Hal ini memicu perubahan komposisi genetik virus saat bereplikasi pada manusia maupun hewan sehingga dapat menimbulkan strain virus baru.⁷

Virus Avian Influenza memiliki delapan gen yang terdiri dari gen Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) yang merupakan gen eksternal; gen Matriks (M); Nukleoprotein (NP); Polimerase A (PA); Polimerase B1 (PB1), Polimerase B2 (PB2) dan gen Non-struktural (NS) yang merupakan gen internal. Ke delapan gen ini masing-masing memiliki *Open Reading Frame* (ORF), sehingga ekspresi proteinnya tidak tergantung satu sama lainnya.^{8,9} Glikoprotein HA memegang peranan penting terhadap *host restriction* transmisi virus AI H5N1 serta patogenesisnya. Pengikatan serta infeksi sel epitel saluran pernafasan manusia sangat penting untuk transmisi virus influenza unggas ke manusia.¹⁰ Glikoprotein HA memperantarai perlekatan virus ke reseptor yang mengandung asam sialat pada permukaan sel inang serta fusi envelop virus dengan membran sel.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa pertukaran spesifisitas reseptor dari SA α 2,3Gal (unggas) ke SA α 2,6Gal (manusia) merupakan faktor utama penentu virus influenza A melewati barrier spesies. Mutasi satu atau dua asam amino dalam glikoprotein HA ternyata cukup untuk mengubah spesifisitas reseptor virus AI dari unggas ke manusia. Virus avian influenza akan dapat beradaptasi pada inang manusia jika pada posisi 193 glikoprotein HA diisi oleh Arginin di tempat pengikatan reseptornya (*receptor binding site*).¹¹ Sementara dari hasil penelitian lainnya bahwa mutasi asam amino glikoprotein HA pada daerah pengikatan reseptor dapat mengubah pengenalan reseptor sel oleh virus dari SA α -2,3Gal menjadi SA α -2,6Gal.¹² Protein HA berperan penting dalam menentukan patogenisitas virus AI H5N1 karena pada regio *cleavage site* gen HA jika diisi asam amino basa tunggal akan dipecah oleh protease inang secara terbatas sehingga infeksinya tidak parah atau asimtomatik, sebaliknya gen HA dengan beberapa asam amino basa pada regio *cleavage site* akan dipecah oleh *ubiquitous* protease sel inang dapat menyebabkan infeksi parah atau sistemik.¹³

Penggunaan hewan coba untuk penelitian virus influenza sudah sering dilakukan. Hewan coba monyet (*Macaca fascicularis*) banyak digunakan untuk menggambarkan infeksi virus influenza pada mamalia (manusia) karena adanya kemiripan fisiologis dengan manusia serta kesamaan letak reseptornya. Disamping itu, hewan coba *ferret* (*Mustela putorius*) merupakan *gold animal* untuk penelitian infeksi virus influenza yang berasal dari manusia karena dapat menimbulkan gejala yang mirip seperti kejadian pada manusia serta kesamaan reseptor dengan manusia.¹⁴ Sementara ayam (*Gallus sp.*) sebagai hewan coba penelitian

virus avian influenza juga sudah biasa digunakan. Dalam bidang penelitian veteriner, inang alaminya dapat digunakan sebagai hewan coba pada penelitian infeksi secara eksperimental.¹⁵

Mengingat masih terjadi wabah virus Avian Influenza subtipe H5N1 pada unggas dan burung liar, bahkan pada manusia, serta potensi virus H5N1 yang dapat beradaptasi pada manusia baik melalui *reassortment* atau mutasi maka perlu dilakukan kajian tentang perubahan virus Avian Influenza H5N1 pada ayam untuk mewakili unggas maupun monyet dan *ferret* untuk mewakili mamalia, terutama pada pola mutasi gen Hemagglutinin.

Dengan tercapainya tujuan penelitian ini, maka dapat diketahui model transmisi virus Avian Influenza subtipe H5N1 asal penderita manusia dari unggas ke mamalia, serta dari mamalia ke unggas sehingga dapat digunakan sebagai landasan ilmiah penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan transmisi virus AI. Hasil penelitian ini juga dapat dipakai sebagai dasar untuk memberikan informasi tentang cara pencegahan terbaik penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 antar spesies sehingga korban manusia bisa dihentikan atau diminimalisir.

METODE

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama berupa infeksi virus H5N1 asal manusia kode D4 pada hewan coba monyet, feret dan ayam. Tahap kedua dilakukan infeksi virus isolat asal hewan coba monyet pada hewan coba ayam.

Dalam penelitian ini digunakan tiga jenis hewan coba yaitu empat ekor monyet (*Macaca Fascicularis*) SPF, yaitu 2 ekor diinfeksi virus dan 2 ekor diberi PBS steril sebagai control; 15 ekor ayam (*Gallus sp.*), 6 ekor diinfeksi virus H5N1 kode D4, 6 ekor diinfeksi isolat virus asal hewan coba ayam

dan 3 ekor diberi PBS steril sebagai control; dan empat ekor *ferret* (*Mustela putorius*) yaitu 2 ekor feret diinfeksi virus H5N1 kode D4 dan 2 ekor diberi PBS steril sebagai kontrol. Untuk menginfeksi hewan coba monyet dan feret diperlukan bahan-bahan berupa isolat virus AI subtipe H5N1 asal manusia (kode D4), Ketamine dan PBS steril. Bahan untuk menginfeksi ayam diperlukan bahan berupa isolat virus AI subtipe H5N1 asal manusia, virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari hewan coba monyet dan PBS steril. Bahan yang diperlukan untuk menginfeksi hewan coba feret yaitu virus AI subtipe H5N1 asal manusia, Ketamine, Xylazine dan PBS steril.

Infeksi virus H5N1 pada hewan coba monyet dilakukan secara intranasal, tonsil dan intraokular dengan dosis sebesar $2,5 \times 10^4$ TCID₅₀ yang diencerkan dalam PBS steril 5 ml. Infeksi pada feret dilakukan secara intranasal dengan dosis 10⁷ PFU yang dilarutkan dalam 500 µl PBS steril. Hewan coba ayam diinfeksi melalui intratrakhea dengan dosis 10⁶ TCID₅₀ yang dilarutkan dalam 500 µl PBS. Isolat shedding virus diperoleh dengan cara mengambil swab nasal dari hewan coba monyet, swab trachea dari hewan coba ayam dan *nasal wash* dari hewan coba feret. Isolat yang diperoleh lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan diambil bagian supernatant.

Isolat yang diperoleh dari hewan coba ayam selanjutnya diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari, sedangkan isolat dari hewan coba monyet dan feret diinokulasikan pada sel MDCK yang telah konfluen. Hasil panen cairan alantois TAB dan media sel MDCK setelah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, selanjutnya dilakukan uji HA untuk mengetahui titer hemagglutinin isolat virus sebagai langkah awal deteksi virus H5N1. Hasil uji HA positif kemudian dilanjutkan dengan RT-PCR gen

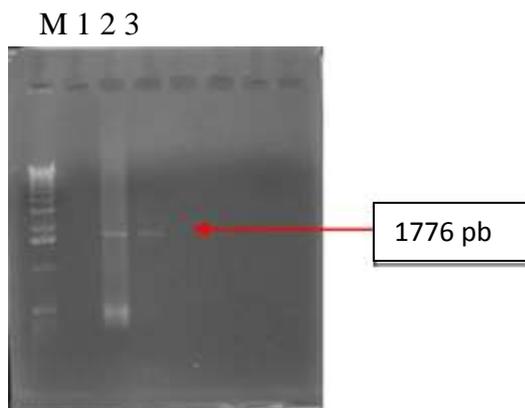
Hemagglutinin virus H5N1 menggunakan primer spesifik untuk gen Hemagglutinin (HA) dan jika positif diperoleh pita sekitar 1780bp melalui proses elektroforesis. Untuk mengetahui urutan nukleotida gen HA hasil RT-PCR selanjutnya dilakukan sekuensing melalui tahapan purifikasi produk PCR, presipitasi dan aplikasi produk PCR ke mesin sekuensing. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan program Genetic Win untuk mendapatkan urutan nukleotida gen HA dan dilakukan alignment (penjejeran) urutan asam amino gen HA antara isolat dari hewan coba monyet, feret dan ayam dengan virus H5N1 asal manusia kode D4. Alignment juga dilakukan antara urutan asam amino gen HA isolat asal hewan coba ayam yang diinfeksi virus isolat asal hewan coba monyet dengan isolat asal hewan coba monyet.

HASIL

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pola mutasi virus Flu Burung H5N1 pada berbagai inang berdasarkan kajian molekular fragmen Hemagglutinin. Penggunaan hewan sebagai hewan model, telah mendapat ijin dari Komisi Etika Universitas Airlangga. Transmisi atau infeksi virus dilakukan melalui dua tahap penelitian.

Tahap pertama dilakukan infeksi virus Avian Influenza subtipe H5N1 dengan kode D4 pada hewan coba monyet, *ferret* dan ayam, dan setelah masa inkubasi masing-masing hewan coba diisolasi *virus "shedding"*. Virus *shedding* dilakukan pengujian dan identifikasi untuk mengetahui perubahan atau mutasi pada fragmen Hemagglutinin (gen HA) melalui alignment urutan asam amino *virus shedding* dengan virus asal. Pada tahap kedua dilakukan infeksi isolat virus asal hewan coba monyet pada hewan coba ayam, *virus shedding* yang diperoleh dilakukan pengujian yang sama dengan tahap pertama.

Performans hewan coba monyet setelah diinfeksi virus H5N1 asal manusia, sampai dengan pengamatan berakhir tidak menunjukkan gejala sakit dan tidak terjadi kematian hewan coba monyet. Pengambilan swab dari hewan coba monyet dilakukan setiap hari selama sepuluh hari pengamatan, dan sampel swab yang menunjukkan hasil positif diperoleh dari pengambilan hari pertama setelah infeksi dari kedua hewan coba monyet. Hasil uji HA swab monyet menunjukkan titer HA sebesar 2^{10} untuk kedua hewan coba monyet, kemudian kedua sampel tersebut dilakukan RT-PCR dan dari hasil PCR diperoleh pita DNA sepanjang 1776 pasang nukleotida (bp).



Gambar 1. Elektroforesis DNA gen Hemaglutinin. DNA yang dihasilkan sebanyak 1776 pb. M = marker (1 kb ladder), 1= kontrol negatif, 2 dan 3 sampel monyet FA dan FB

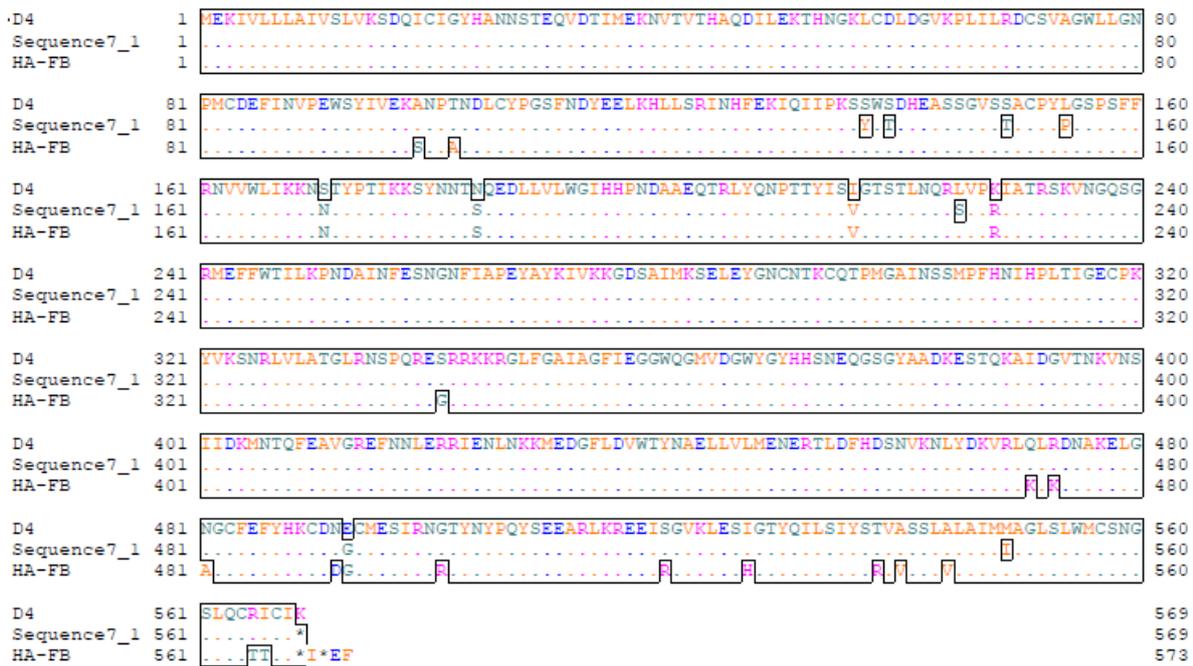
Hasil PCR ini kemudian dilanjutkan dengan sekuensing untuk menentukan urutan nukleotida gen hemaglutinin virus *shedding* D4 pada monyet. Hasil penjejeran (*alignment*) urutan nukleotida gen HA dari isolat virus *shedding* dengan urutan nukleotida gen HA virus D4 menunjukkan homologi sebesar 97,8 % atau terjadi mutasi 2,2% untuk hewan coba monyet kode FA, dan homologi sebesar 97,1% atau 2,87% untuk hewan coba monyet kode FB.

Selanjutnya urutan nukleotida yang

diperoleh dilakukan prediksi susunan asam amino dari kodon awal yang mengkode asam amino metionin. Jumlah asam amino yang menyusun protein hemaglutinin sebanyak 560 asam amino. Selanjutnya dari hasil urutan asam amino yang diperoleh dilakukan penjejeran (*alignment*) urutan asam amino gen HA virus asal manusia (kode D4) dengan urutan asam amino gen HA isolat virus hewan coba monyet untuk mengetahui mutasi yang terjadi saat virus diinfeksi pada hewan coba monyet. Jumlah mutasi asam amino yang terjadi pada hewan coba monyet kode FA sebesar 1,93%, sedangkan mutasi pada hewan coba monyet kode FB 3,51%. *Alignment* asam amino gen HA virus D4 dengan virus *shedding* monyet FA dan FB seperti pada Gambar 2.

Protein hemaglutinin memiliki regio khusus yang disebut regio *cleavage site* yaitu regio tempat dimana terjadi pembelahan (*cleavage*) gen HA0 menjadi HA1 dan HA2 sehingga virus influenza menjadi infeksiif ketika terjadi infeksi virus. Berdasarkan analisis penjejeran protein hemaglutinin, virus kode D4 yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan *multiple base amino acid* (asam amino basa berulang) pada *cleavage site* gen HA yang sesuai dengan gambaran virus HPAI. Urutan asam amino regio *cleavage site* virus kode D4 yaitu Pro (prolin), Gln (glutamin), Arg (arginin), Glu (glutamat), Ser (serin), Arg (arginin), Arg (arginin), Lys (lisin), Lys (lisin), Arg (arginin), Gly (glisin) dan Leu (leusin) atau PQRESRRKKRGL. Analisis penjejeran antara protein HA virus D4 dengan virus yang diperoleh dari hewan coba monyet (monyet FA dan FB), nampak terjadi mutasi asam amino pada regio *cleavage site* yaitu asam amino nomor 341 yang semula Serin menjadi Glisin (mutasi S341G) pada isolat yang berasal dari monyet kode FB. Sementara isolat dari hewan coba monyet kode FA tidak

menunjukkan adanya mutasi pada regio tersebut.



Gambar 2 : Alignment asam amino gen HA virus D4 dengan virus shedding monyet FA dan FB

Protein hemagglutinin memiliki daerah khusus untuk pengikatan reseptor sel yang disebut receptor binding domain (RBD), yaitu bagian RBD tersebut memiliki urutan asam amino khusus yang tidak mudah bermutasi dan jika mengalami mutasi akan menyebabkan perubahan pengenalan reseptor sel *host* atau disebut asam amino *conserved*. Pada penelitian ini asam amino *conserved* di bagian RBD juga menunjukkan mutasi yaitu pada posisi 216 dari Isoleusin menjadi Valin (I216V), asam amino nomor 225 dari Leusin menjadi Serin (L225S) dan asam amino nomor 228 dari Lisin menjadi Arginin (K228R) diperoleh dari isolat hewan coba monyet kode FA. Sementara isolat dari hewan coba monyet kode FB menunjukkan dua mutasi yaitu I216V dan K228R.

Posisi asam amino tertentu pada gen HA dikenal sebagai penanda pengenalan reseptor sel inang yaitu asam amino nomor 224 dan

226 (berdasarkan penomoran H5). Jika residu 224 diisi Glutamat dan 226 diisi Gisin maka virus tersebut lebih mengenali reseptor tipe unggas (α -2,3).¹¹ Virus kode D4 yang digunakan dalam penelitian ini memiliki residu Arginin pada posisi 224 dan residu Valin pada posisi 226. Kedua residu asam amino pada posisi tersebut tidak mengalami mutasi pada hewan coba monyet.

Infeksi virus H5N1 asal manusia pada hewan coba feret tidak menunjukkan gejala sakit kecuali saat pengambilan *nasal wash* ke-3 dan ke-4 hewan coba feret mengalami bersin, suhu tubuh tidak mengalami peningkatan, berat badan tidak turun dan sedikit penurunan nafsu makan. *Nasal wash* dari hewan coba feret diambil setiap 12 jam selama 10 hari, dan *shedding virus* diperoleh dari pengambilan *nasal wash* ke-2 sampai pengambilan ke-8 dengan titer HA sebesar 2^7 .

Disamping itu juga dijumpai adanya mutasi di regio *cleavage site* pada asam amino nomor 341 dari asam amino Serin/S menjadi Glisin/G atau S341G. Daerah RBD dari protein hemaglutinin virus yang diisolasi dari hewan coba *ferret* yang diinfeksi virus kode D4 menunjukkan adanya mutasi pada asam amino nomor 216 dari asam amino Isoleusin/I

menjadi Valin/V (I216V), asam amino nomor 225 dari asam amino Leusin/L menjadi Serin/S (L225S) dan asam amino nomor 228 dari asam amino Lisin/K menjadi Arginin/R (K228R).

Infeksi virus H5N1 asal manusia pada 6 ekor hewan coba ayam menunjukkan performans seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 Performans Ayam yang diinfeksi virus H5N1 kode D4

Pengamatan Ke	Ck-D4.1	Ck-D4.2	Ck-D4.3	Ck-D4.4	Ck-D4.5	Ck-D4.6	Kontrol
1	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat
2	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat	Sehat
3	Sehat	Mati	Lemah	Sehat	Sehat	Lemah	Sehat
4	Lemah		Mati	Sehat	Perdarahan jengger dan diare	Perdarahan jengger dan diare	Sehat
5	Mati, perdarahan kaki			Mati, perdarahan kaki			Sehat
6							Sehat

Tabel 2 Hasil Uji HA Virus Sampel Swab Ayam Yang Diinfeksi virus H5N1 kode D4

Pengambilan swab ke	CkD4.1	CkD4.2	CkD4.3	CkD4.4	CkD4.5	CkD4.6
1	Negatif	Negatif	2 ⁴	Negatif	Negatif	Negatif
2	Negatif	2 ³	Negatif	Negatif	Negatif	2 ⁷
3	2 ⁷	2 ⁶ (Mati)	2 ⁷	Negatif	2 ⁷	Negatif
4	Negatif		Negatif (Mati)	Negatif	Negatif (Mati)	2 ⁷ Mati
5	2 ⁷ Mati			2 ⁷ (Mati)		

Keterangan : CkD4.1= hewan coba ayam yang diinfeksi virus kode D4, angka 1 menunjukkan nomor ayam

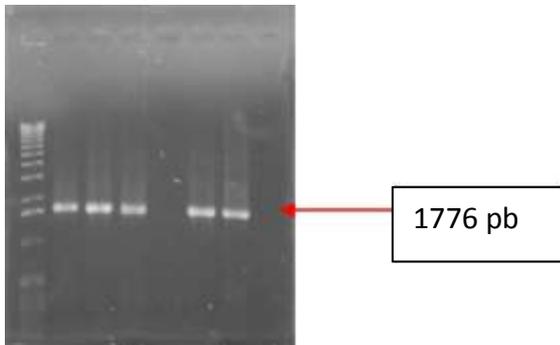
Shedding virus dari hewan coba ayam kemudian dilakukan PCR gen Hemaglutinin dan diperoleh pita DNA sebesar 1776 bp seperti pada Gambar 5.

Hasil PCR kemudian dilanjutkan dengan sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida gen HA. Sampel virus dari hewan coba ayam yang dianalisis *alignment* dengan virus kode D4 berasal dari isolat ayam no 6.

Dari urutan nukleotida gen HA yang didapat kemudian dilakukan penjejeran dengan urutan nukleotida gen HA dari virus kode D4, maka diperoleh perbedaan nukleotida yang terjadi sebesar 4,16%.

Selanjutnya urutan nukleotida gen HA yang diperoleh dilakukan prediksi asam amino dan dilakukan *alignment* dengan urutan asam amino gen HA virus D4, maka didapat

perbedaan asam amino antara gen HA virus kode D4 dengan isolat dari hewan coba ayam sebesar 5,09%. Data *alignment* asam amino virus D4 dengan virus *shedding* ayam sebagaimana pada Gambar 6.



Gambar 5. Elektroforesis DNA gen HA virus AI H5N1 kode D4 pada hewan coba ayam. DNA yang dihasilkan sebesar 1776 pb. M = marker, 1,2,3,5 dan 6 sampel positif dari ayam nomor 1,2,3,5 dan 6, 4 = sampel negatif dari ayam nomor 4.

Hasil penjejeran asam amino antara virus AI kode D4 dengan isolat virus dari hewan coba ayam yang diinfeksi virus D4, juga menunjukkan adanya mutasi di regio *cleavage site* pada asam amino nomor 341 atau -6HA1 dari asam amino Serin/S menjadi Glisin/G (S341G).

Bagian RBD protein hemagglutinin isolat virus dari ayam yang diinfeksi virus kode D4 menunjukkan adanya mutasi pada asam amino nomor 216 dari Isoleusin/I menjadi Valin/V (I216V), asam amino nomor 225 dari Leusin/L menjadi Serin/S (L225S) dan asam amino nomor 228 dari Lisin/K menjadi Arginin/R (K228R).

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peranan inang (*host*) dalam mekanisme penularan virus Flu Burung antar spesies pada hewan coba melalui proses infeksi virus Flu Burung H5N1 pada spesies hewan mamalia (monyet dan *ferret*) serta

unggas (ayam). Infeksi virus influenza pada inang bertujuan agar virus dapat bereplikasi dengan menggunakan perangkat genetik yang dimiliki oleh sel inang. Di lain pihak, karena virus Flu Burung merupakan virus bergenoma RNA yang bersegmen, sehingga mudah mengalami mutasi ketika terjadi replikasi virus di dalam sel *host*. Ketika terjadi infeksi virus Flu Burung pada inang, biasanya akan terjadi *shedding virus*. Isolat ini bisa diisolasi dari trakea dan kloaka pada golongan unggas, melalui nasal pada golongan mamalia atau ketika terjadi refleks bersin dan batuk.

Virus *shedding* yang dikeluarkan tersebut merupakan virus yang sudah mengalami adaptasi dan replikasi pada inang. Virus ini jika terjadi mutasi pada waktu replikasi di dalam sel inang maka mutasi tersebut dapat dianalisis melalui analisis genom dari virus *shedding* yang diperoleh. Mutasi yang terjadi pada genom virus *shedding* tersebut akan dapat memicu virus *shedding* mengalami perubahan sifat dari virus asal yang diinfeksi sehingga memungkinkan virus yang semula tidak dapat menular antar manusia berubah menjadi virus yang bisa menular antar manusia. Dasar molekuler sifat *host range restriction* virus avian influenza masih belum diketahui dengan jelas, tetapi glikoprotein HA merupakan penentu utama pertukaran inang karena peranannya pada pengenalan reseptor sel inang.

Gen HA merupakan gen eksternal yang memiliki fungsi untuk mengenali reseptor yang mengandung asam sialat pada permukaan sel sehingga akan berpengaruh terhadap kemampuan transmisi virus antar spesies, serta memperantarai fusi dari *envelope* virus dengan membran endosomal dari sel inang sehingga menyebabkan dikeluarkannya nukleokapsid ke dalam sitoplasma.¹⁶ Di samping itu, gen HA juga

Dalam penelitian ini, didapatkan mutasi berupa substitusi asam amino pada protein hemaglutinin/HA dengan variasi sekitar 1,5% - 3% dari virus *shedding* tiap spesies hewan coba. Namun, untuk analisisnya hanya difokuskan pada daerah kritis yang nantinya dapat menentukan kemampuan transmisi virus maupun patogenisitas virus. Bagian protein HA yang berperan pada patogenisitas virus yaitu regio *cleavage site*, sedangkan daerah yang berpengaruh terhadap transmisi antar spesies dijumpai di bagian *globular head* protein hemaglutinin terutama pada *receptor binding domain/RBD*.

Berdasarkan penelitian Nidom, virus AI H5N1 yang berasal dari ayam di Indonesia memiliki urutan asam amino pada regio *cleavage site* yaitu PQRERRRKKRGL sehingga digolongkan sebagai virus HPAI karena memiliki *multiple base amino acid*.⁸ Disebutkan lebih lanjut pada penelitian lain bahwa isolat virus unggas dari tahun 2003-2005 sebagian besar menunjukkan motif PQRERRRKKRGL pada *cleavage site*.¹⁷ Pada bulan Maret 2005 ditemukan isolat virus unggas dengan motif PQRESRRKKRGL yang mengindikasikan telah terjadi mutasi R→S pada daerah HA1. Tiga bulan setelah itu, pada bulan Juni 2005, Indonesia mempunyai kasus manusia yang terinfeksi virus AI H5N1 untuk pertama kalinya, dan urutan asam amino pada *cleavage site* dari virus Flu Burung ini memiliki motif PQRESRRKKRGL.

Virus AI H5N1 kode D4 yang digunakan dalam penelitian ini memiliki motif sekuen *cleavage site* PQRESRRKKRGL, setelah diinfeksi ke monyet maka pada virus *shedding* monyet dijumpai adanya mutasi S→G di *cleavage site* pada residu asam amino nomor 341 sehingga urutan asam amino *cleavage site* menjadi PQREGRRKKRG. Dalam hal ini terjadi mutasi S341G, dari serin diganti glisin pada HA1. Mutasi yang sama

juga dijumpai ketika virus AI H5N1 diinfeksi ke *ferret* dan ayam. Ini membuktikan bahwa residu asam amino nomor 341 atau HA1 yang berada di *cleavage site* dapat mengalami mutasi pada *host* mamalia maupun unggas. Bahkan saat virus *shedding* dari monyet diinfeksi ke ayam, tampaknya residu nomor 341 gen HA juga mengalami mutasi dengan motif G→S sehingga sekuen *cleavage site* menjadi kembali ke motif awal PQRESRRKKRGL. Hasil ini menunjukkan bahwa regio *cleavage site* di bagian residu nomor 341 sangat rentan mengalami mutasi ketika terjadi replikasi virus pada *host*, bahkan ketika mengalami dua kali pasase pada *host* yang berbeda yaitu dari mamalia ke unggas mutasi yang terjadi seperti menata kembali motif *cleavage site* virus ke bentuk awal. Hasil ini merupakan suatu temuan baru, bahwa adanya perubahan atau mutasi yang “menari” atau bersifat tidak permanen pada regio *cleavage site* gen HA virus AI sub tipe H5N1 setelah dipasasekan pada *host* yang berbeda. Hal ini dapat menimbulkan pertanyaan baru, urutan asam amino yang ditemukan pada *cleavage site* gen HA virus AI H5N1 asal manusia yang ditemukan selama ini, menunjukkan suatu mutasi yang bersifat permanen atau merupakan hasil mutasi yang berubah-ubah sebagaimana yang ditemukan pada penelitian ini. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Dharmayanti, ada satu isolat ayam yang ditemukan dari tahun 2007 memiliki asam amino G pada residu nomor 341/HA1 di *cleavage site* gen HA sehingga memiliki motif *cleavage site* PQREGRRKKRGL.¹⁷ Berarti asam amino G pada residu 341/HA1 *cleavage site* gen HA virus tersebut bukan berasal dari mutasi R menjadi G, tetapi dari R menjadi S kemudian S bermutasi menjadi G. Jadi asam amino G pada residu 341 dijumpai setelah virus mengalami pasase pada 2 *host* berbeda,

dan ada kemungkinan pasase pertama terjadi pada mamalia yang tanpa menunjukkan gejala klinis.

Protein hemagglutinin merupakan suatu trimer yang memiliki bagian yang disebut *globular head*, di bagian ini terdapat tempat untuk mengikat reseptor dari sel inang (*receptor binding domain/RBD*). Semua struktur HA memiliki konfigurasi RBD yang mirip. Tempat pengikatan-heliks pada bagian HA1 disusun oleh asam amino nomor 188-190 atau disebut *190-helix* dan dua *loop* yang disusun oleh asam amino nomor 134-138 (*130-loop*) dan 221-228 (*220-loop*).¹¹ Residu asam amino *conserved* di bagian RBD dari virus subtipe H1 dan H5 yang nantinya berimplikasi terhadap spesifitas reseptor terdiri atas asam amino nomor 98, 136, 153, 183, 190, 193, 194, 216, 221, 222, 225, 226, 227 dan 228.

Pada penelitian ini, jika virus D4 diinfeksi ke monyet, *ferret* dan ayam, maka residu asam amino di sekitar *receptor binding domain* yang mengalami mutasi dijumpai pada residu nomor 216, 225 dan 228, kecuali monyet kode FB hanya mengalami mutasi asam amino nomor 216 dan 228. Namun ketika virus *shedding* monyet FB diinfeksi ke ayam maka mutasi asam amino nomor 225 muncul. Hasil ini menunjukkan bahwa satu kali pasase virus pada *host* sudah dapat menyebabkan gen HA di bagian *receptor binding domain* mengalami mutasi dan mutasinya bisa lebih dari satu asam amino. Mutasi di *receptor binding domain* dengan motif G228S atau Q226L dan G228S akan menyebabkan virus AI H5N1 dapat mengenal reseptor tipe manusia (α -2,6).¹¹ Mutasi motif N158D, N224K dan Q226L menyebabkan virus AI H5N1 dapat mengenali reseptor tipe manusia (α -2,6) dan dapat ditransmisikan antar *ferret* secara aerosol.¹⁶ Ini membuktikan bahwa mutasi di

bagian *receptor binding domain* sangat berperan dalam menentukan kemampuan virus AI H5N1 untuk dapat mengenal reseptor tipe manusia dan menular antar mamalia. Perlu diketahui pula bahwa pergeseran spesifitas pengikatan ke reseptor dari Sia α -2,3 menjadi Sia α -2,6 merupakan tahap penting adaptasi virus avian influenza pada *host* manusia.¹⁶ Untuk itu perlu perhatian apabila terjadi wabah virus AI H5N1 pada unggas berulang kali, maka ada kemungkinan dapat mendorong virus AI H5N1 dapat mengenal reseptor tipe manusia serta dapat menular antar manusia. Penelitian yang dilakukan oleh Yamada, setelah virus avian influenza asal bebek dipasasekan sebanyak 19 kali pada burung puyuh ternyata terjadi mutasi 8 asam amino di daerah pengikatan reseptor dan virus tersebut dapat tumbuh pada sel epitel bronkus manusia (mengenal reseptor α -2,6).¹² Hal ini mengindikasikan bahwa burung puyuh dapat berperan sebagai *intermediate host* potensial untuk adaptasi virus avian influenza sehingga virus tersebut dapat ditransmisikan ke manusia.

Dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang membuat mutasi buatan pada beberapa asam amino melalui metoda *reverse genetic*, hal ini menyebabkan virus tersebut mengenal reseptor tipe manusia (α -2,6) bahkan memicu terjadinya transmisi virus antar *ferret*. Dalam penelitian ini, tidak dilakukan perubahan asam amino secara buatan melainkan dilakukan infeksi virus Flu Burung dari alam yaitu melalui proses infeksi virus D4 pada *host* mamalia dan unggas, dan ternyata asam amino dengan nomor yang sama tidak mengalami mutasi dari virus asalnya.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan :

1. Terjadi mutasi gen HA pada regio *cleavage site* residu nomor 341 virus AI H5N1 asal penderita manusia setelah transmisi pada hewan model monyet, *ferret* dan ayam.
2. Terjadi mutasi gen HA di *receptor binding domain* pada *loop-220* virus AI H5N1 asal penderita manusia setelah transmisi pada hewan model monyet, *ferret* dan ayam.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harder TC and Warner O. Avian Influenza. Dalam Influenza Report. New.Engl.J.Med. 2006. Diakses dari: <http://www.influenzareport.com.Htm>
2. Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, and Suarez DL. Protection Against Diverse Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Chickens Immunized with a recombinant Fowl Pox Vaccine Containing an H5 Avian Influenza Hemagglutinin Gene Insert. Vaccine. 2000;18(11-12):1088-1095.
3. Knipe DM, Peter MH. Fields Virology. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins 2007;2:1691-1740
4. Subbarao, K., Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, et al. Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. Science; 1998; 279(5349): 393-396
5. WHO, 2015. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. Available via; http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2015_01_26/en/index.html. Accessed at 15 February 2015.
6. Raharjo J, dan Nidom CA. Avian Influenza: Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. GITA Pustaka. 2004.\
7. Ligon BL. Avian Influenza Virus H5N1: A Review of Its History and Information Regarding Its Potential Cause Next Pandemic. Semin Pediatr Infect Dis. 2005 Oct;16(4):326-335.
8. Nidom CA.. Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi Doktor. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga; 2005.
9. Horimoto and Kawaoka, 2005. T. Horimoto, Y. Kawaoka Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. J. Virol., 68 (5) (1994), pp. 3120–3128
10. Yan Su, Yang HY, Zhang BJ, Jia HL and Tien P. Analysis of Point Mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells. Arch.Virol. 2008;153:2253-2261.
11. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JM, Paulson JC, Wilson IA, Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. Science. 2006 Apr;21;312(5772):404-10.
12. Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Suzuki T, Suzuki Y, Mai Le Q, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivallier P, Chen LM, Donis RO, and Kawaoka Y. Adaptation of a Duck Influenza A Virus in Quail. J Virol. 2012;86(3):1411.
13. Li Z, Liu Z, Ma C, Zhang L, Su Y, Gao GF, Li Z, Cui L and He W. Identification of amino acids in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus hemagglutinin that determine avian influenza species specificity. Arch.Virol. 2011;156;1803-1812.
14. Bouvier NM and Lowen AC, 2010. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. Viruses. www.mdpi.com/journal/viruses
15. Haga T, and Horimoto T. Animal Models to Study Influenza Virus Pathogenesis and Control. Open Antimic. Agents J. 2010;2;15-21
16. Imai M and Kawaoka Y. The Role of Receptor Binding Specificity in Interspecies Transmission of Influenza Viruses. Curr Opin Virol. 2012;2(2):160-7. Diakses dari situs: www.sciencedirect.com16
17. Dharmayanti I. Perubahan Genom dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Indonesia. Disertasi Doktor. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2009.

IN SILICO DOCKING MOLEKULAR ANTITUBERKULOSIS TERHADAP TARGET ENZIM ALANIN RACEMASE DAN TIMIDILAT SINTASE MYCOBACTERIUM TUBERKULOSIS H37Rv

St Khaerunnisa¹, Suhartati¹, Ira Humairah¹, Reza Arta Bagaskoro Nugroho¹

¹Departemen Biokimia Kedokteran FK Universitas Airlangga

E-mail: annisa_biokim10@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi mematikan yang menjadi salah satu keadaan darurat global akibat peningkatan kasus *multiple drug-resistant*. Pendekatan inovatif diperlukan untuk merancang obat baru dalam melawan tuberkulosis. Penemuan urutan genom *Mycobacterium tuberculosis* membuka pintu berbagai penelitian dalam identifikasi dan validasi target baru pengembangan Obat Anti Tuberkulosis (OAT). Salah satu yang dikembangkan adalah Inhibitor enzimatik. *Alanin racemase* berperan penting dalam sintesis peptidoglikan dinding bakteri melalui racemasi L-alanin ke D-alanin. *Timidilat sintase* merupakan enzim kunci pada sintesis *de novo* DNA yang mengkatalisis sintesis *thymidine monophosphate*, suatu prekursor nukleotida dalam sintesis DNA.

Metode: Sekuens protein *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase Mycobacterium tuberculosis H37Rv* dari *TB Genomes Database* (TBGD) dilakukan evaluasi dengan *swissmodel*. *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase* sebagai makromolekul dilakukan *docking* dengan flavonol alang-alang, kuersetin, isoniazid dan Rifampisin. *Docking* menggunakan *Autodock4*. Visualisasi 3D hasil *docking* dievaluasi menggunakan *PyMol*.

Hasil: Hasil *docking* dan visualisasi terhadap kompleks *Alanin racemase*-ligan menunjukkan hasil paling baik dengan isoniazid (ΔG -6,56 dan K_i 15,65 μM). Interaksi kompleks *Timidilat sintase* - ligan menunjukkan hasil paling baik dengan flavonol alang-alang (ΔG -3,61 dan K_i 2,28 μM).

Simpulan: Flavonol alang-alang *insilico* lebih efektif bekerja menghambat *Timidilat sintase* dibandingkan *Alanin racemase* sebagai kandidat Obat Anti Tuberkulosis (OAT) baru.

Kata kunci: Tuberkulosis, *Alanin racemase*, *Timidilat sintase*, Docking, Flavonoid.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit mematikan yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Kasus resisten *multidrug* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* telah menyebabkan peningkatan utama morbiditas dan mortalitas tuberkulosis di seluruh dunia.¹ Penyakit tuberkulosis diperkirakan menginfeksi sekitar 36 juta orang di seluruh dunia dari tahun 2002 hingga 2020.² Indonesia merupakan negara terbesar

kelima di dunia yang memiliki masalah tuberkulosis setelah India, Cina, Afrika Selatan dan Nigeria.³ Kenaikan jumlah penderita tuberkulosis telah menimbulkan kekhawatiran global dan memerlukan perhatian serius untuk meninjau berbagai aspek terapi tuberkulosis.

Terapi TB pertama saat ini, terdiri dari fase awal pengobatan dengan 4 macam obat selama 2 bulan (2RHZE- Rifampisin, Isoniazid, Pirazinamid, dan Etambutol), diikuti oleh pengobatan dengan Isoniazid

(INH) dan Rifampisin (RIF) selama 4 bulan.⁵ Kelemahan utama terapi TB adalah lamanya pemberian obat, rendahnya angka kepatuhan minum obat, efek samping obat, dan resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT).⁶ Oleh karena itu, pendekatan inovatif diperlukan untuk merancang obat dengan target obat baru untuk mengatasi infeksi tuberkulosis.

Pengembangan dan penemuan obat memerlukan waktu yang panjang dan upaya multidisipliner. Metode penemuan obat baru yang berkembang saat ini adalah dengan komputasi. Metode komputasi (*In silico*) telah berkembang pesat dan banyak digunakan untuk pengembangan dan pengujian farmakologi. Metode *In silico* termasuk pencarian database, kuantitatif struktur-hubungan aktivitas, identifikasi *farmakophore*, pemodelan dan *docking*.⁷

Penemuan obat diawali dengan identifikasi sasaran obat dilanjutkan optimasi ligan untuk memenuhi sejumlah kriteria yang telah ditetapkan sebelumnya klinis. *Computer-aided drug* dapat merancang melalui pendekatan bioinformatika dalam memfasilitasi proses penemuan obat.

Computer-aided desain obat, sering disebut desain berbasis struktur yang melibatkan menggunakan informasi biokimia dari interaksi ligan-reseptor. Komputasi berperan dalam optimalisasi ligan untuk meningkatkan afinitas antara ligan dengan reseptor. Informasi kompatibilitas reseptor-ligan dapat dilakukan melalui *docking*. *Docking* adalah metode yang memprediksi orientasi target ligan ketika terikat satu sama lain untuk membentuk sebuah kompleks yang stabil.⁸

Penyusun utama dinding *Mycobacterium tuberculosis* adalah asam mikolat, lilin kompleks (*complex-waxes*), trihalosa dimikolat, dan *mycobacterial sulfolipids*. Asam mikolat merupakan asam lemak rantai

panjang yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan dengan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* merupakan target utama molekul obat selain regulasi DNA.

Berbagai obat anti tuberkulosis ditargetkan pada biosintesis dinding sel. Mdluli dan Spigelman (2006) memperlihatkan *Alanin racemase* (Alr) dan *D-Ala-D-Ala ligase* merupakan enzim yang mengkatalisis biosintesis peptidoglikan. Target obat lain yang dikembangkan adalah dengan target biosintesis DNA. Penelitian Brancher (2009) menunjukkan *Timidilat sintase* (TS) merupakan target anti-TB yang baru. *Timidilat sintase* merupakan enzim kunci pada sintesis *de novo* DNA yang mengkatalisis sintesis *thymidine monophosphate* (TMP), suatu prekursor nukleotida sintesis DNA.

Beberapa penelitian menyatakan bahwa flavonoid berperan sebagai antibakteri melalui mekanisme kerusakan membran sitoplasmik dengan menghasilkan hidrogen peroksida, menghambat sintesis asam nukleat dan menghambat ATP sintase.⁹

Alang-alang (*Imperata cylindrica*) merupakan salah satu tanaman famili Gramineae yang keberadaannya sering dianggap gulma. Berdasarkan studi literatur, akar tumbuhan ini memiliki banyak aktivitas biologis di antaranya memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi dan memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan.^{10,11}

Melalui pemodelan struktur 3D enzim *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase* dapat diketahui interaksi antara enzim dengan substrat sehingga dapat memprediksikan inhibitor yang tepat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Pada penelitian ini akan dilakukan pemodelan struktur 3D enzim *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase* melalui program komputer pemodelan protein menggunakan pendekatan teknik homologi.

Selanjutnya akan dilakukan *docking* dengan ligan flavonoid.

Penelitian ini merupakan langkah awal membangun model kimia inhibitor anti tuberkulosis target enzim *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase* secara *insilico*.

METODE

Program Pendukung Penelitian

Program *ChemBio Office* 2010 untuk menggambar ligan, *Discovery Studio Visualizer* 2.5 untuk menampilkan struktur 3D protein, *SUPERPOSE* untuk analisis perubahan struktur, *PROCHECK* untuk validasi model 3D, dan *Autodock4* untuk *docking* molekuler. Analisis dan visualisasi hasil *docking* menggunakan program *PyMol*. Sistem operasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Microsoft Windows XP* versi 2007.

Target Sekuens

Alanin racemase

Sekuens protein *Alanin racemase* diperoleh dari TB database dengan situs www.genome.tdb.org. Sekuens yang dipilih pada varian *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan kode akses (GB:AL123456) pada lokus Rv3423c.

> Rv3423c | alanine racemase alr | translated sequence

MKRFWENVGKPNDDTDGRGTTSLAMTP
ISQTPGLLAEMVDLGAIEHNVRVLREH
AGHAQLMAVVKADGYGHGATRVAQTA
LGAGAAELGVATVDEALALRADGITAPV
LAWLHPPGIDFGPALLADVQVAVSSLRQ
LDELLHAVRRTGRTATVTVKVDTGLNR
NGVGPAQFPAMLTALRQAMAEDAVRLR
GLMSHMVYADKPDDSINDVQAQRFTAF
LAQAREQGVRFVAHLSNSSATMARPD
TFDLVRPGIAVYGLSPVPALGDMGLVPA
MTVKCAVALVKSIRAGEGVSYGHTWIA
PRDTNLALLPIGYADGVFRSLGGRLEVL

NGRRCPGVGRICMDQFMVDLGPGLDV
AEGDEAILFGPGIRGEPTAQDWADLVGTI
HYEVVTSRGRITRITYREAENR*

Timidilat sintase

> Rv2754c | *Timidilat sintase* thyX | translated sequence

MAETAPLRVQLIAKTDLAPPDVPWTTD
ADGGPALVEFAGRACYQSWKPNPKTA
TNAGYLRHIIDVGHFSVLEHASVSFYITGI
SRSCTHELIRHRHFSYSQLSQRYVPEKDS
RVVPPGMEDDADLRHILTEAADAARA
TYSELLAKLEAKFADQPNAILRRKQARQ
AARAVLPNATETRIVVTGNYRAWRFIA
MRASEHADVEIRRLAIECLRQLAAVAPA
VFADFEVTTLADGTEVATSPLATEA*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh residu asam amino pada *Alanin racemase* dan *Timidilat sintase* H37Rv terhadap kompleks dengan flavonoid dari alang-alang (flavonol), Isoniazid dan Rifampisin dianalisis menggunakan *docking*. Program *docking* yang digunakan adalah *Autodock4*. *Autodock4* digunakan untuk menampilkan hasil interaksi antara enzim dan substrat melalui energi bebas pengikatan. Proses *docking* diawali dengan menyiapkan molekul enzim dan ligan (Tahap Preparasi Makromolekul-Ligan).

Hasil *docking* menggunakan *Autodock4* selanjutnya divisualisasikan menggunakan perangkat lunak *PyMol*. Analisis *docking* dapat dilihat melalui interaksi enzim-ligan pada daerah sisi aktif enzim. Hasil interaksi dapat ditunjukkan oleh jumlah ikatan hidrogen yang dibentuk (bola berwarna merah) dan ikatan Van Der Waals-elektrostatik (bola berwarna hitam) yang terjadi antara ligan dengan residu aktif di sekitar substrat. Hasil interaksi juga dapat dievaluasi dari data energi bebas pengikatan (ΔG) yang dihasilkan. Energi bebas pengikatan bernilai negatif

menunjukkan bahwa reaksi berlangsung spontan. Semakin negatif maka interaksi yang terjadi maka semakin kuat. Hal tersebut menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi baik digunakan sebagai inhibitor.

Proses *docking* dalam penelitian ini disimulasikan pada kondisi lingkungan tertentu. Kondisi lingkungan pada saat *docking* berbeda dengan yang dilakukan dengan laboratorium basah. Perbedaan terdapat pada tidak adanya molekul air, perbedaan pH dan perbedaan temperatur.

Hasil dari *docking* tidak dapat sepenuhnya digunakan untuk mengganti penelitian laboratorium basah, tetapi hasil *docking* dapat digunakan sebagai pendekatan secara *in silico* untuk mengetahui interaksi yang terjadi pada kompleks enzim-substrat. Keefektifan interaksi makromolekul-ligan dalam dilihat dari energi bebas pengikatan. Interaksi makromolekul-ligandengan energi bebas pengikatan terendah akan dilanjutkan dengan penelitian laboratorium basah.

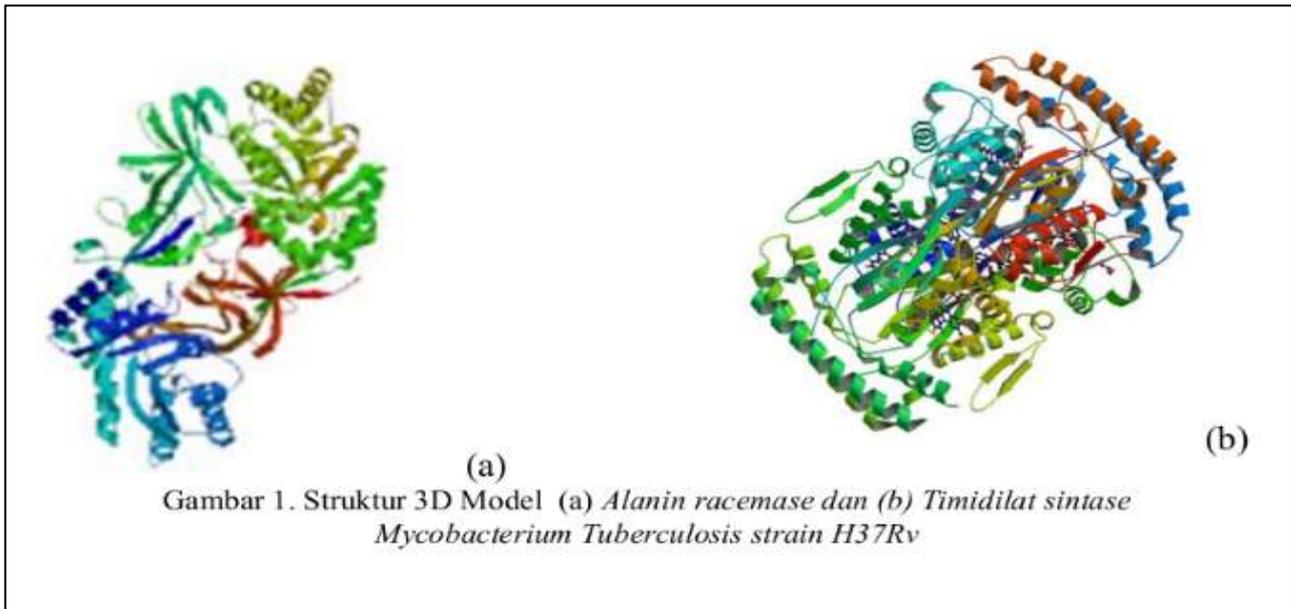
***Alanin racemase* dari *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Potensi antimikroba melalui inhibitor enzim telah dilaporkan, namun secara klinis penggunaan inhibitor ini masih terbatas karena kurangnya penelitian terhadap target khusus

dan tingkat toksisitas. Inhibitor analog *non-substrat* dan beberapa inhibitor melalui mekanisme yang berbeda dikembangkan sebagai target obat. Proses penemuan obat baru tuberkulosis (TB) terus berkembang, beberapa peneliti memilih *Alanin racemase* sebagai target. *Alanin racemase* (EC 5.1.1.1) berperan penting pada biosintesis dinding sel melalui rasemasi L-alanine ke D-alanin. Rasemasi merupakan kunci penting dalam biosintesis peptidoglikan dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*.¹²

Pemodelan struktur 3D enzim *Alanin racemase* pada penelitian ini mendapatkan hasil terbaik dengan metode homologi. Cetakan dengan homologi tertinggi terdapat pada 1XFCA. Alanin rasemase merupakan salah satu enzim golongan isomerase dan memiliki struktur homodimer. Penelitian ini mempergunakan sekuens cetakan 1XFCA dari *Alanin racemase Mycobacterium tuberculosis* yang telah dikristalkan di *Protein Data Bank* (PDB).

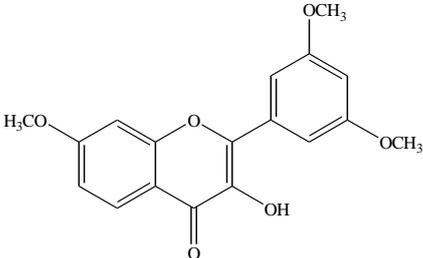
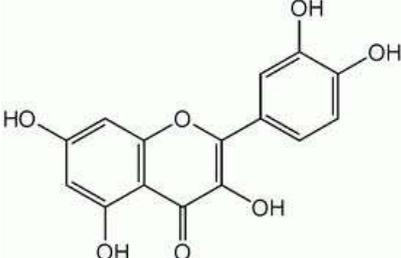
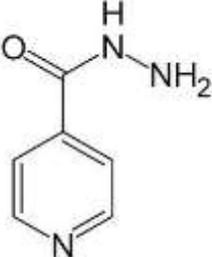
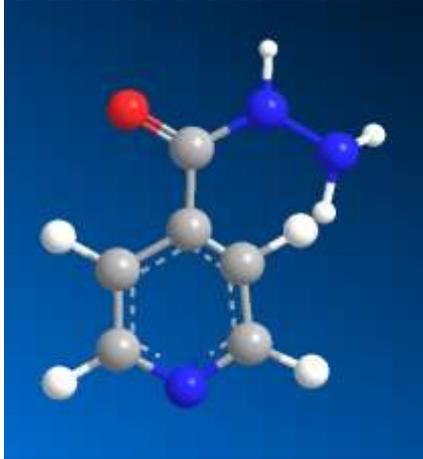
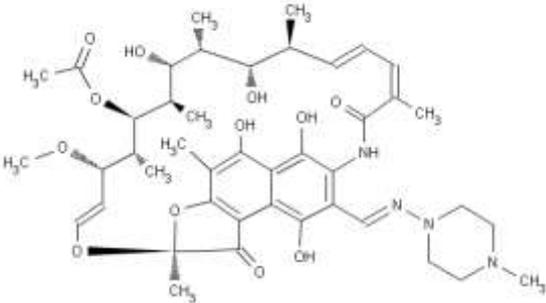
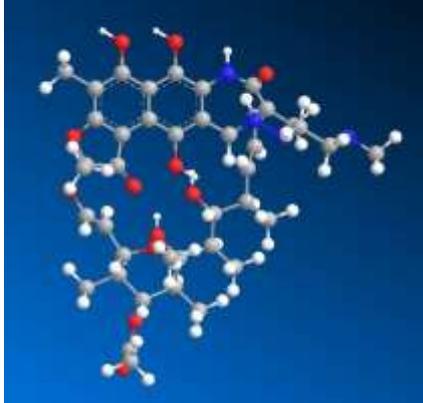
Cetakan ini dijadikan acuan *wild type*. Sekuens *Alanin racemase* H37Rv merupakan sekuens *Alanin racemase* dari *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv yang diperoleh dari pustaka TB database. Kedua sekuens ini didapatkan beberapa perbedaan susunan asam amino.



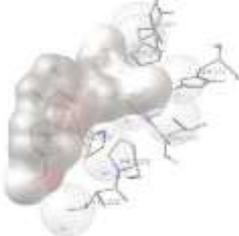
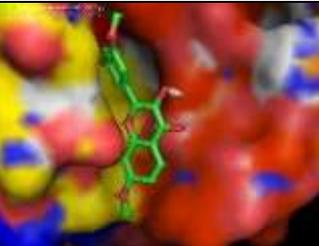
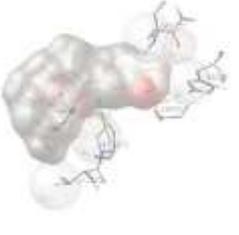
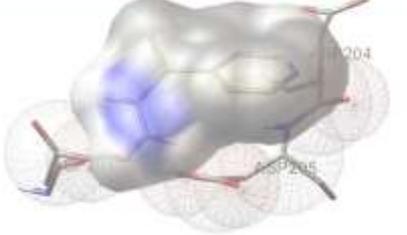
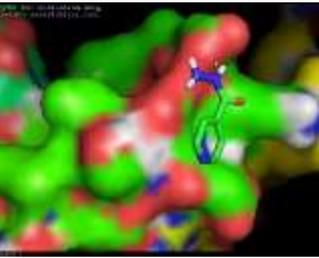
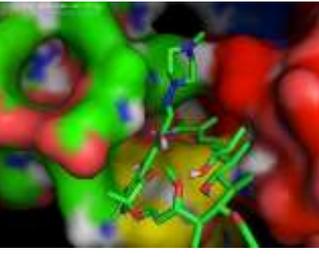
Tabel 1. Hasil data *docking* antara makromolekul-ligan dengan mempergunakan perangkat lunak *Autodock4*

Makro molekul	Ligand	AG	Ki	Ikatan Van Der Wals	Σ Ikatan Hidrogen
ALR	7',3',5'-trimetoksiflavonol	-4,8	303,5 μM	Val 272, Pro 273, Pro 368, Ser 264, Leu 260, His 387, Pro 274	1
ALR	Quarsetin	-3,73	1,84 mM	Pro 168, Asp 268, Val 272, Pro 273, Ser 261, His 387, Gln 377	1
ALR	Isoniazid	-6,56	15,64 μM	Asp201, Asp204, Asp205	-
ALR	Rifamficin	-2,95	6,89 μM	Tyr 199, Ala 200, Lys 202, Ala 262, Pro 264, Asp 268, Thr 365, Ile 365	-
TS	7',3',5'-trimetoksiflavonol	-3,61	2,28	Met198, His203	1
TS	Quarsetin	-3,23	4,29 mM	Pro 168, Val 272, Pro 273, Asp 273, Ser 261, Gln 377, His 367	1
TS	Isoniazid	-5,08	189,38 μM	Glu 92, Arg 199, Asp 205	-
TS	Rifamficin	4,43	-	Arg 92, Met 198	-

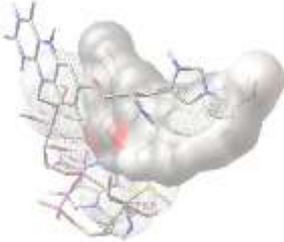
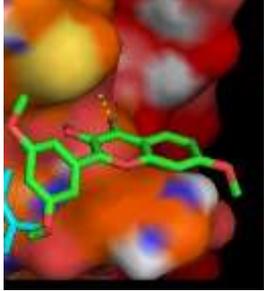
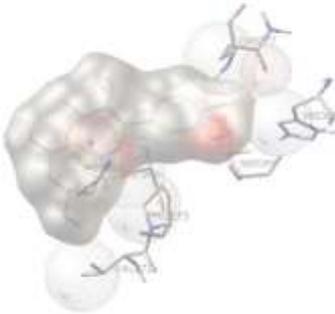
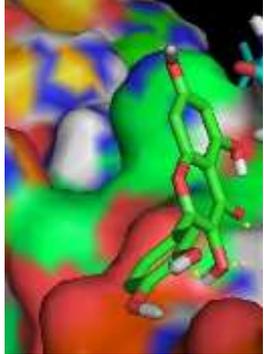
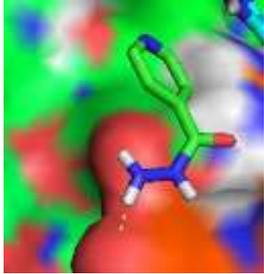
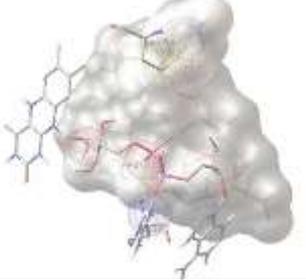
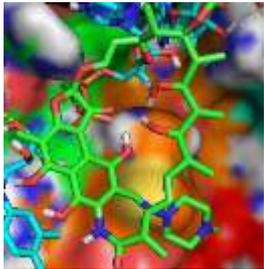
Tabel 2. Hasil Struktur Kimia Ligan Menggunakan Perangkat Lunak *ChemBio Office 2010* dan Struktur 3D dengan Software *ChemBio3D Draw 2010*

Ligan	Struktur Kimia	Struktur 3D
7',3',5'- trimetoksi flavonol	 <p>The chemical structure shows a flavonol core with a methoxy group (H₃CO) at the 7' position, another methoxy group (OCH₃) at the 3' position, and a third methoxy group (OCH₃) at the 5' position. It also features a hydroxyl group (OH) and a carbonyl group (C=O) on the central ring.</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the 7',3',5'-trimethoxyflavonol molecule, showing the spatial arrangement of atoms with carbon in grey, oxygen in red, and hydrogen in white.</p>
Kuarsetin	 <p>The chemical structure of quercetin shows a flavonol core with hydroxyl groups (OH) at the 3, 5, 7, and 3' positions, and a carbonyl group (C=O) at the 4 position.</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the quercetin molecule, showing the spatial arrangement of atoms with carbon in grey, oxygen in red, and hydrogen in white.</p>
Isoniazid	 <p>The chemical structure of isoniazid consists of a pyridine ring substituted with a hydrazide group (-CONHNH₂).</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the isoniazid molecule, showing the spatial arrangement of atoms with carbon in grey, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen in white.</p>
Rifampisin	 <p>The chemical structure of rifampicin is a complex polycyclic molecule featuring a naphthylisoquinoline core with multiple methyl groups (CH₃), hydroxyl groups (OH), and a piperazine ring substituted with a methyl group (CH₃).</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the rifampicin molecule, showing the complex spatial arrangement of atoms with carbon in grey, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen in white.</p>

Tabel 3. Hasil Konformasi *Alanin racemase*-ligan Mempergunakan Perangkat Lunak *Autodock4* dan Visualisasi Hasil *docking* dengan Perangkat Lunak *PyMol*

Makromolekul - Ligan	Hasil <i>docking</i> dengan <i>software</i> <i>Autodock4</i>	Hasil Analisis <i>docking</i> dengan <i>PyMol</i>
<i>Alanin racemase</i> - 7',3',5'-trimetoksi Flavonol		
<i>Alanin racemase</i> - Kuarsetin		
<i>Alanin racemase</i> - Isoniazid		
<i>Alanin racemase</i> - Rifampisin		

Tabel 4. Hasil Konformasi *Timidilat sintase*-ligan Mempergunakan Perangkat Lunak *Autodock4* Dan Visualisasi Hasil Docking Dengan Perangkat Lunak *PyMol*

Makromolekul - Ligan	Hasil <i>docking</i> dengan <i>software</i> <i>Autodock4</i>	Hasil Analisis <i>docking</i> dengan <i>PyMol</i>
<i>Timidilat sintase</i> - 7',3',5'-trimetoksi flavonol		
<i>Timidilat sintase</i> - Kuarsetin		
<i>Timidilat sintase</i> - Isoniazid		
<i>Timidilat sintase</i> - Rifampisin		

Docking *Alanin racemase*- Ligan

Ikatan *Alanin racemase* dengan flavonol alang-alang memiliki energi bebas sebesar -4,8 dengan konstanta inhibisi 303,5 μ M. Hal ini menunjukkan energi yang terbentuk di antara keduanya memiliki afinitas yang besar. Ikatan *Alanin racemase* dengan kuersetin memiliki energi bebas sebesar -3,73 dengan

konstanta inhibisi 1,84 mM. Hal ini menunjukkan energi yang terbentuk di antara keduanya memiliki afinitas yang besar. Ikatan *Alanin racemase* dengan Isoniazid memiliki energi bebas sebesar -6,46 dengan konstanta inhibisi 15,64 μ M. Hal ini menunjukkan ikatan yang terbentuk memiliki perubahan energi yang sangat elektronegatif.

Interaksi *Alanin racemase*-Isoniazid menunjukkan ikatan yang sangat stabil. Interaksi substrat ligan Rifampisin di daerah sisi aktif dapat dilihat pada tabel. Ikatan Alanin rasemase dengan Rifampisin memiliki energi bebas sebesar -2,95 dengan konstanta inhibisi 6,89 μ M. Hal ini menunjukkan ikatan yang terbentuk memiliki perubahan energi elektronegatif yang kecil, menunjukkan ikatan yang terbentuk stabil.

Rifampisin telah dikenal dapat menghambat sintesis RNA-DNA bakteri dengan cara inhibisi RNA polimerase.¹³ Data struktur kristal dan data biokimia menunjukkan bahwa rifampisin berikatan dengan RNA polimerase di lokasi yang berdekatan dengan pusat aktif RNA polimerase dan menghambat sintesis RNA dengan menghambat perpanjangan produk RNA.^{14,15} Pada beberapa antibiotik, target protein memainkan peran penting terhadap transkripsi dan translasi. Contohnya Rifampisin, berikatan dengan bakterial β subunit RNA polimerase (*rpoB*), dan streptomisin dengan target subunit 30S ribosoma.

Bakteri yang resisten terhadap antibiobiotik melalui mutasi gen dan menyebabkan perubahan transkripsi dan translasi.¹⁶

Secara penapisan maya flavonol dari alang-alang memiliki energi afinitas pengikatan yang lebih rendah setelah isoniazid. Hal ini mengindikasikan flavonol alang-alang merupakan ligan yang baik untuk menghambat *Alanin racemase* H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* selain isoniazid.

***Timidilat sintase* dari *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Metilasi enzimatik pada atom C5 dari uridil menjadi bentuk (ribo)-timidil terjadi selama metabolisme DNA dan RNA pada semua organisme. Enzim yang digunakan

untuk proses katalis reaksi penting ini adalah *Timidilat sintase* A (Thy-A) yang menggunakan metilen tetrahidrofolat sebagai sumber karbon dan mereduksi agen menjadi bentuk timidilat, suatu prekursor esensial DNA.

Pemodelan struktur 3D enzim *Timidilat sintase* pada penelitian ini menggunakan metode homologi. Pada metode homologi, dilakukan pencarian cetakan DNA menggunakan *Swiss Model* untuk mendapatkan cetakan DNA dengan homologi tertinggi yang diperoleh dari PDB. Cetakan dengan homologi tertinggi didapatkan pada 3gwcA. Timidilat sintase merupakan golongan enzim transferase, homotetramer.

Hasil yang diperoleh dari *docking* menggunakan *Autodock4* adalah interaksi masing-masing ligan (flavonol, kuersetin, isoniazid, Rifampisin) di daerah sisi aktif dan energi bebas dari kompleks enzim-substrat. *Autodock tools* digunakan untuk menganalisis hasil *docking* dari *Autodock4*. Hasil Interaksi dapat dievaluasi dari jumlah ikatan hidrogen yang dibentuk (bola berwarna merah) dan ikatan Van Der Walls-elektrostatik (bola berwarna hitam) yang terjadi antara substrat dengan residu aktif di sekitar substrat.

Docking *Timidilat sintase*– Ligan

Dalam simulasi *docking* ini flavonol mempunyai energi bebas paling rendah jika dibandingkan dengan kuersetin, isoniazid dan Rifampisin. Flavonol alang alang juga mempunyai konstanta inhibisi paling rendah sebesar 2,28 μ M jika dibandingkan dengan kuersetin (4,29 mM) dan Isoniazid (189,38 μ M). Energi bebas pengikatan ligan didapatkan Timidilat sintase–kuersetin -3,23, Timidilat sintase–Isoniazid -5,08.

SIMPULAN

Hasil *docking* dan visualisasi terhadap kompleks *Alanin racemase*-ligan menunjukkan hasil paling baik dengan isoniazid (ΔG -6,56 dan K_i 15,65 μM). Interaksi kompleks *Timidilat sintase*-ligan menunjukkan hasil paling baik dengan flavonol alang-alang (ΔG -3,61 dan K_i 2,28 μM). Flavonol alang-alang *in silico* lebih efektif bekerja menghambat *Timidilat sintase* dibandingkan *Alanin racemase* sebagai kandidat Obat Anti Tuberkulosis (OAT) baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas dukungan moril maupun materil, serta kepada (1) Prof. Dr. Nancy Margarita Rehatta, dr, SpAN.KIC(K), (2) Much Zaenal Fanani dan (3) Ilma Amalina atas bantuan penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aagaard, MC, Movaerts, LM, Okkels, P, Andersen, JM, Pollock. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:3719–3728.
2. WHO Report. Global tuberculosis control: Surveillance, Planning, Financing. 2005.
3. WHO Report, Global Tuberculosis Control: Tuberculosis Facts. 2010.
4. Zhang, Y, Marten, KP, Denkin, S. Drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today.* 2006;11(1-2):1359-6446.
5. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberculosis, Edisi 2. Jakarta: Percetakan Negara RI, 2007.
6. Chopra, P, Meena LS, Singh Y. New drug targets for *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Med. Res.* 2003;117:1-9.
7. Archana, Sathishkumar N, Bharati N. *In silico* docking analysis of curcumin—an inhibitor for obesity. *Ijpbs*, 2010; 1(4): 224-235.
8. Lengauer, T, Rarey, M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996;6(3):402–406.
9. Chinnam, N., Dadi, PK., Sabri, SA., Ahmad, M., Kabir, MA., & Ahmad, Z, Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner, *International Journal of Biological Macromolecules.* 2010; 46(5):478– 486.
10. Khaerunnisa, St. Pemanfaatan Senyawa Bioaktif Dari Akar Alang-alang (*Imperata cylindrica*) Sebagai Bahan Antioksidan. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga; 2009.
11. Khaerunnisa, St. Pengaruh pemberian ekstrak etanol dan fraksi etil asetat alang-alang (*Imperata cylindrica*) terhadap beberapa profil lipid serum dan superoxide dismutase (SOD) eritrosit *Rattus norvegicus* Hiperkolesterolemia. Tesis. Surabaya: Universitas Airlangga; 2012,
12. Archana, Sathishkumar N, Bharati N. *In silico* docking analysis of curcumin—an inhibitor for obesity. *Ijpbs*. 2010; 1(4): 224-235.
13. Cushnie, T., & Lamb, AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2006; 26(5):343-356.
14. Cushnie, TPT., & Lamb, AJ. Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005;26(5):343-356.
15. Mdluli K, Spigelman, M. Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(5): 459-467.
16. Deves, C, Assunção, TM, Basso, LA, Santos, DS. The adenylosuccinate lyase enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* as a target for development of new anti-TB drugs, V Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação–PUCRS, 2010;1031-1033.

KLONING GEN PENYANDI Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*

Sri Aprilianti Idris^{1,2}, Wayan T Artama³, Ning Rintiswati¹

¹Ilmu Kedokteran Tropis, UGM, ²Akademi Analisis Kesehatan Bina Husada, Kendari

³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM

E-mail: sri.aprilianti@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Tingginya prevalensi tuberkulosis di Indonesia mendukung pemerintah untuk melakukan pemberantasan tuberkulosis diantaranya melalui pencegahan dengan cara vaksinasi dan pengobatan. Pengobatan saat ini masih menjadi pilihan utama namun karena adanya resistensi menyebabkan pengobatan menjadi terhambat, sehingga perlu upaya lain dalam pemberantasan tuberkulosis salah satunya melalui vaksinasi. *Mycobacterium tuberculosis* memiliki enzim transferase *mycolyl* yang dikenal sebagai kompleks antigen 85 (Ag85A, Ag85B, Ag85C). Kompleks Antigen 85 (Ag85) adalah anggota fibronektin yang mengikat protein dan dianggap sebagai faktor virulensi yang potensial. Antigen 85B merupakan antigen yang sangat penting dan paling dominan diantara kompleks antigen yang lain. Antigen yang disekresikan ini dapat menginduksi respon imun dan menstimulasi produksi IFN- γ yang diujikan pada hewan coba. Penelitian ini bertujuan mengamplifikasi gen penyandi protein Ag85B dan mengkloningkan gen tersebut dalam vektor kloning *E. coli* strain BL21.

Metode: Penelitian ini dimulai dengan mengamplifikasi gen Ag85B dari isolat DNA *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan metode PCR, kemudian hasil PCR diligasi ke vektor plasmid pET SUMO serta ditransformasi ke One Shot® BL21 (DE3) Chemically Competent *E. coli*. Hasil transformasi di tumbuhkan ke media Luria Bertani (LB) padat yang mengandung 50 μ g/ml kanamisin. Koloni yang tumbuh direkultur ke media Luria Bertani (LB) cair yang juga mengandung 50 μ g/ml kanamisin dan selanjutnya diisolasi plasmidnya menggunakan *High Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid).

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan adanya koloni bakteri yang tumbuh pada plat LB dan adanya pertumbuhan pada rekultur LB cair. Selanjutnya dilakukan uji tapis/uji gen *insert* dalam plasmid menggunakan metode PCR, hasil PCR menunjukkan hasil positif dengan adanya pita dengan panjang 978 bp pada hasil elektroforesis yang sesuai dengan panjang gen Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*.

Kesimpulan : Dari hasil penelitian gen penyandi Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* dapat diamplifikasi dan dikloning pada vektor pET SUMO.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B, Kloning, Tuberkulosis.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah utama kesehatan global. *World Health Organization (WHO)* memperkirakan sepertiga

dari populasi dunia telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)*. Tuberkulosis menyebabkan gangguan kesehatan pada jutaan orang setiap tahun dan

termasuk peringkat atas sebagai penyebab utama kematian akibat penyakit menular di seluruh dunia, setelah *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).¹

Pada tahun 2012, diperkirakan 8,6 juta orang menderita tuberkulosis dan 1,3 juta meninggal akibat penyakit ini (termasuk 320.000 kematian diantaranya mengidap HIV-positif). Kasus kematian tuberkulosis juga terjadi pada anak-anak, terdapat 530.000 kasus tuberkulosis pada anak yang berusia di bawah 15 tahun dan ditemukan 74.000 kasus kematian akibat tuberkulosis pada anak dengan HIV-negatif pada tahun 2012 (6% dan 8% dari total global HIV). Tuberkulosis dapat dijumpai hampir disetiap negara, tetapi persentasinya tertinggi pada mayoritas kasus di seluruh dunia pada tahun 2012 terdapat di Asia Tenggara (29%), Afrika (27%), dan daerah Pasifik Barat (19%). Kasus tuberkulosis di India dan Cina sendiri dilaporkan sebesar 26% dan 12% dari total kasus tuberkulosis di dunia.¹

Indonesia merupakan negara keempat terbesar didunia berdasarkan jumlah populasi penduduknya, berada diperingkat keempat tertinggi dari 22 negara yang dianggap memiliki beban tinggi oleh WHO, dengan perkiraan terdapat 450.000 untuk kasus baru pertahun. Prevalensi tuberkulosis di Indonesia pada tahun 2013 adalah 297 per 100.000 penduduk, yang berarti total kasus tuberkulosis pada tahun 2013 mencapai sekitar 800.000 sampai 900.000 kasus.¹ Data tersebut memperlihatkan tingginya penyebaran tuberkulosis di dunia termasuk di Indonesia, hal ini mendorong kita untuk melakukan upaya-upaya pemberantasan tuberkulosis baik dalam hal pengobatan maupun pencegahan dini terhadap penularan tuberkulosis melalui vaksinasi.

Pengobatan saat ini masih menjadi pilihan utama dalam pemberantasan tuberkulosis, namun karena adanya resistensi

obat maka pemberantasan tuberkulosis menjadi terhambat. Tingginya resistensi obat terhadap bakteri *M. tuberculosis* mendorong kita untuk melakukan upaya yang lain dalam hal pencegahan infeksi tuberkulosis salah satunya dengan pengembangan vaksinasi.

Saat ini, satu-satunya vaksin terhadap tuberkulosis adalah *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), suatu vaksin *attenuated bacteria* yang berasal dari *Mycobacterium bovis* dan telah digunakan sejak tahun 1920. Vaksin BCG telah memberikan perlindungan terhadap tuberkulosis pada anak, tetapi efektivitas perlindungan dalam pencegahan penularan infeksi tuberkulosis paru pada orang dewasa masih bervariasi. Diperkirakan bahwa pengaruh vaksinasi BCG tidak lagi signifikan hampir selama sepuluh tahun terakhir dan vaksinasi BCG sudah tidak memiliki dampak yang diperlukan terhadap epidemi tuberkulosis global. Saat ini pengembangan vaksin untuk pencegahan tuberkulosis masih terus dikembangkan dengan menggunakan gen dari *M. tuberculosis* itu sendiri.²

Penampilan strain baru dari *M. tuberculosis* yang resisten terhadap antibiotik konvensional telah menimbulkan dorongan untuk mencari vaksin yang lebih baik dan penemuan obat-obatan terhadap *M. tuberculosis*, untuk tujuan ini identifikasi pengenalan utama antigen oleh respon imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* masih menjadi langkah utama. *Mycobacterium tuberculosis* memiliki enzim transferase *mycolyl* yang dikenal sebagai kompleks antigen 85 (Ag85A, Ag85B, Ag85C), ketiganya memiliki aktivitas enzimatis yang terlibat pada rangkaian asam mycolic ke arabinogalactan dari dinding sel dan dalam biogenesis pada *cord factor*³. Kompleks Ag85 ini dianggap menjadi faktor virulensi yang diperlukan untuk kelangsungan hidup intrasel

dalam makrofag, disisi lain komponen Ag85 sangat bersifat imunogenik.⁴

Kompleks Antigen 85 (Ag85) adalah anggota fibronektin yang mengikat protein dan dianggap sebagai faktor virulensi yang potensial. Protein ini dikode oleh gen *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC*, gen ini mengatur secara independen pada tingkat transkripsi. Ketiga protein memainkan peran dalam sintesis dinding sel sebagai katalis transportasi asam mycolic.³

Kelompok antigen 85 diekspresikan pada rasio stabil 03:02:01 (Ag85B:Ag85A:Ag85C). Antigen 85B dengan berat molekul 30 kDa adalah antigen yang paling dominan dan bertanggung jawab untuk hampir 25% dari total protein ekstraseluler. Antigen 85B merupakan kandidat vaksin yang sangat penting. Vaksinasi yang dilakukan dengan menggunakan hewan coba marmut yang diinduksi antigen 85B *M. tuberculosis* memberikan kekebalan protektif yang signifikan terhadap paparan aerosol *M. tuberculosis* daripada vaksin BCG konvensional *Mycobacterium bovis*.³

Kloning merupakan suatu bentuk perbanyakkan molekul majemuk seperti gen, DNA atau antibodi, dari suatu individu yang secara genetik identik antara molekul induk dengan yang dihasilkan. Gen penyandi Ag85B *M. tuberculosis* dikloning untuk memperbanyak gen tersebut yang nantinya dapat dilanjutkan untuk menghasilkan protein rekombinan yang dapat dijadikan sebagai uji diagnostik dan vaksinasi. Hingga saat ini, vaksin BCG konvensional masih dijadikan sebagai vaksin utama dalam perlindungan dini terhadap *M. tuberculosis*, namun perlindungan dari vaksin BCG ini hanya efektif mencegah tuberkulosis milier atau meningitis pada anak-anak, tetapi tidak memberikan perlindungan untuk tuberkulosis paru pada orang dewasa yang bersifat tuberkulosis laten dan reaktivasi.

Berdasarkan pada informasi diatas, mendorong peneliti-peneliti dengan memanfaatkan teknologi di bidang rekayasa genetika untuk mengembangkan uji diagnostik baru dan vaksinasi dari protein rekombinan yang berasal dari gen *M. tuberculosis* yaitu Ag85B yang dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi tuberkulosis.⁵

Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen penyandi protein Ag85B dan mengkloningkan gen tersebut dalam vektor kloning *E. coli* BL21.

METODE

Gen *fbpB* diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer *Forward* (5'-CAC CAT GAC AGA CGT GAG CCG AAA GAT TC -3') dan primer *Reverse* (5' -GCC GGC GCC TAA CGA ACT CT -3'). Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan PCR dalam 50 μ L volume reaksi yang terdiri dari 25 μ L PCR Mix, 4 μ L primer forward, 4 μ L primer reverse, 13 μ L ddH₂O, dan 4 μ L DNA *template*. Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus dengan predenaturasi selama 5 menit dengan suhu 94⁰C; setiap siklus terdiri atas denaturasi selama 1 menit pada suhu 94⁰C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 55⁰C, dan ekstensi selama 1 menit pada suhu 72⁰C. Tahap ekstensi diperpanjang selama 10 menit pada suhu 72⁰C. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 2% dan pengamatan dilakukan transiluminator ultraviolet yang akan memperlihatkan pita yang spesifik untuk Ag85B dengan ukuran 978 bp.

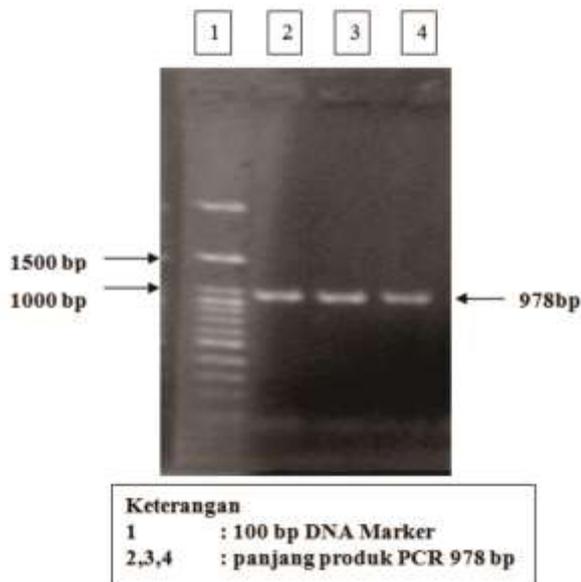
Produk PCR diligasi ke vektor plasmid pET SUMO serta ditransformasi ke One Shot® BL21 (DE3) *chemically competent E. coli*. Hasil transformasi ditumbuhkan ke media Luria Bertani (LB) padat yang mengandung kanamisin. Koloni yang tumbuh dikultur ke media Luria Bertani (LB) cair yang juga

mengandung kanamisin dan selanjutnya diisolasi plasmidnya menggunakan *High Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid). Selanjutnya hasil isolasi plasmid di lakukan uji tapis untuk mengidentifikasi koloni bakteri yang membawa gen *insert* melalui teknik PCR.

kanamisin dan selanjutnya diisolasi plasmidnya menggunakan *High Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid). Hasil dari media LB padat dapat dilihat pertumbuhan koloni bakteri yang terpisah yang dapat dilihat seperti pada gambar di bawah (Gambar 2).

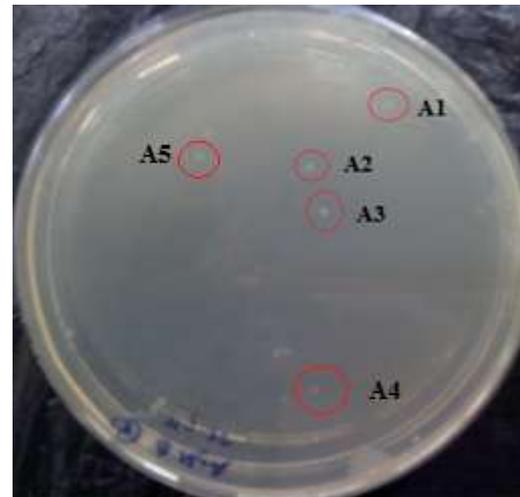
HASIL

Penelitian ini mengamplifikasi Ag85B dari DNA *M. tuberculosis* dengan menggunakan metode PCR. Produk PCR menunjukkan hasil positif dengan adanya pita dengan panjang 978bp pada hasil elektroforesis yang sesuai dengan panjang gen Ag85B *M. tuberculosis* (Gambar 1).



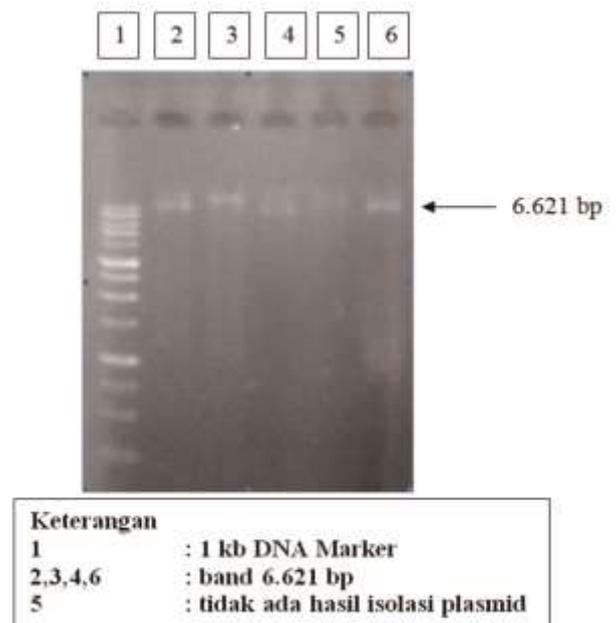
Gambar 1. Produk PCR amplifikasi Ag85B

Hasil amplifikasi kemudian dikloning, proses kloning terdiri dari dua tahap yaitu tahap ligasi untuk membuat DNA Plasmid dan tahap transformasi yang bertujuan untuk menyisipkan DNA plasmid ke dalam sel inang dengan menggunakan bakteri *E.coli* BL21. Hasil transformasi kemudian ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat yang mengandung kanamisin 50 µg/mL selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh direkultur ke media Luria Bertani (LB) cair yang juga mengandung



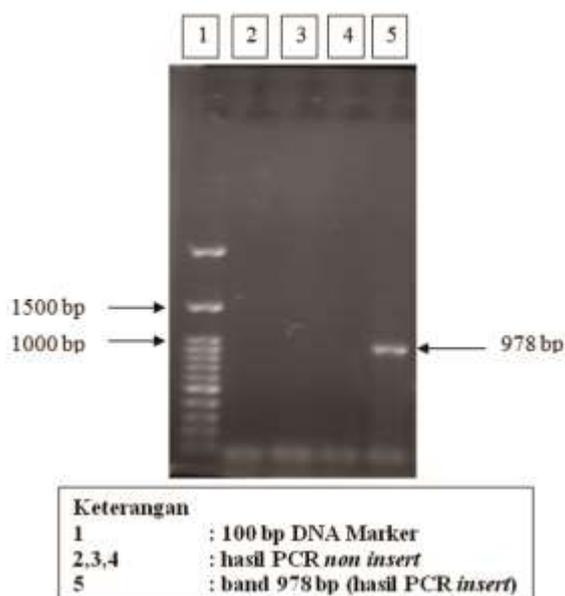
Gambar 2. Hasil Pertumbuhan Koloni Bakteri pada Media LB padat

Koloni yang tumbuh kemudian diisolasi dengan menggunakan *High Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid). Hasil isolasi plasmid dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Elektroforesis Hasil Isolasi Plasmid

Pengujian gen dalam plasmid dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Primer yang digunakan adalah primer *forward* dan *reverse* Ag85B dan template yang digunakan adalah plasmid yang telah diisolasi koloninya dari media LB. Dari kelima hasil isolasi plasmid, hanya satu hasil isolasi yang tidak menunjukkan hasil pada panjang 6.621 bp. Keempat hasil isolasi plasmid kemudian dilanjutkan dengan uji tapis menggunakan metode PCR selanjutnya dielektroforesis untuk melihat panjang pita yang dihasilkan. Hasil positif dapat dilihat dengan terbentuknya pita yang sesuai dengan panjang gen Ag85B sebesar 978bp. Hasil PCR dari plasmid dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Elektroforesis Hasil PCR plasmid

PEMBAHASAN

Dalam beberapa tahun terakhir, upaya-upaya telah dilakukan untuk mengembangkan diagnostik dan vaksin baru terhadap TBC. Protein 30 kDa merupakan protein utama ekstraseluler dari *M. tuberculosis* yang sangat penting. Beberapa laporan yang menjelaskan tentang kloning dan ekspresi Ag85 kompleks

M. tuberculosis dengan menggunakan vektor yang berbeda. Reza zarif *et al.*, melaporkan penelitian tentang kloning dan ekspresi Ag85B menggunakan vektor pET101/D dan *E. coli* TOPO10. Penelitian sebelumnya berhasil mengamplifikasi gen target dengan panjang 978 bp dan berhasil ke tahap ekspresi protein Ag85B dan mempurifikasi protein rekombinan tersebut. Penelitian tentang kloning Ag85A, Ag85B, dan Ag85C, ekspresi gen pada ketiga antigen tersebut menggunakan vektor pET23b yang berisi promotor T7 dan *E. coli* (DE3).³ Penelitian yang dilakukan Kremer berhasil mengkloning hingga ke tahap produksi protein rekombinan Ag85A dan Ag85C, namun gagal menghasilkan protein rekombinan Ag85B dalam jumlah banyak.

Penelitian ini menggunakan vektor pET SUMO dan bakteri *E. coli* BL21 sebagai sel inang untuk memperbanyak gen penyandi Ag85B yang telah disisipkan pada vektor. Secara umum, proses kloning diawali dengan mengamplifikasi gen target menggunakan metode PCR. Penelitian ini berhasil mengamplifikasi gen target dengan menggunakan primer yang sesuai dengan gen target Ag85B *M. tuberculosis* dengan panjang target 978 bp. Proses amplifikasi dilanjutkan dengan kloning gen melalui proses ligasi dan transformasi. Proses ligasi yaitu menyambungkan gen penyandi Ag85B ke dalam vektor pET SUMO dengan bantuan enzim ligase. Vektor pET SUMO dirancang untuk memfasilitasi kloning dari produk PCR untuk ekspresi pada *E. coli*. pET SUMO menyediakan tempat insersi produk PCR yang langsung ke dalam plasmid. Enzim *taq polymerase* menghasilkan tambahan *single deoxyadenosine* (A) ke ujung 3' dari produk PCR. Vektor plasmid pET SUMO memiliki residu *single deoxythymidine* (T) pada ujung 3' sehingga insert PCR dapat diligasi dengan efisien ke dalam plasmid. Plasmid ini

kemudian ditransformasi ke dalam *E. coli* BL21 dan ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat dan rekultur LB cair. Dari hasil pada media LB terlihat pertumbuhan 5 koloni bakteri yang selanjutnya koloni tersebut diisolasi dan dilakukan uji tapis dengan menggunakan metode PCR untuk mengidentifikasi apakah gen yang diinginkan ter- *insert* ke dalam plasmid. Hasil elektroforesis menunjukkan dari kelima sampel hanya satu sampel yang berhasil *insert*, sedangkan 4 koloni yang tumbuh tidak membawa gen *insert*. Plasmid yang mengalami transformasi tidak semuanya mengandung gen yang diinginkan. Beberapa plasmid mungkin berhasil dalam proses ligasinya dan gen dapat masuk ke dalam plasmid, namun beberapa plasmid mungkin juga tidak berhasil dalam ligasinya sehingga tidak ada gen yang masuk ke dalam plasmid seperti yang terjadi pada 4 koloni yang tumbuh namun tidak membawa gen *insert*.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian gen penyandi Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* dapat di amplifikasi dan di kloning pada vektor pET SUMO. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk studi lebih lanjut di daerah endemik Tuberkulosis menggunakan gen ini sebagai pengembangan vaksin dan diagnostik terhadap penanggulangan Tuberkulosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS.,Sp.MK.(K) melalui program RINAS (Riset Nasional) Tahun 2014 yang telah memberikan dukungan dana untuk melaksanakan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Laboratorium

Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan UGM dan kepada Yayasan Bina Husada Kendari sebagai institusi asal peneliti yang telah memberikan dukungan sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report..* Geneva: WHO Report; 2013.
2. Dietrich, J., Aagard, C., Leah, R, Olsen, A. W., Stryhn, A., Doherty, T.M., Andersen, P. Vaccine Efficacy. *Immunol.* 2014;174:6332-6339.
3. Zarif, R., Sankian, M., Gholubi, a, Farshadzadeh, Z., Soleimanpour, S., Youssefi, F. Varasteh, A R. Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* major secreted protein antigen 85B (Ag85B) in *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(2):112–116.
4. Piubelli, L., Campa, M., Temporini, C., Binda, E., Mangione, F., Amicosante, M., Pollegioni, L. Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microb Cell Fact.* 2013;12:115.
5. Pascal Launois., Annie Drowart., Eliane Bourreau., Pierre Couppie., Claire-Michèle Farber., Jean-Paul Van Vooren., Kris Huygen. T Cell Reactivity against Mycolyl Transferase Antigen 85 of *M. tuberculosis* in HIV-TB Coinfected Subjects and in AIDS Patients Suffering from Tuberculosis and Non tuberculous Mycobacterial Infections. *Clin Dev Immunol.* 2011;10:1155-1166.
6. Andersen, A.B., and Brennan, P. Protein and Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom, B.R. (eds). Tuberculosis Pathogenesis, Protection And Control. *Am Soc Microbiol.* 1994;72(11):6471-6479
7. Edward E.A., Jensen ER., Pisani E. Evaluation of the World Bank's Assistance in Responding to the AIDS Epidemic: Indonesia Case Study. The World Bank, Washington.

8. Bothamley, G. H., and Rudd, R. M. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Div Thoracic Med.* 1994;7: 240-24.
9. Brown, T.A. Gene cloning and DNA analysis. 5th ed. 2006. Blackwell Publishing, Oxford.
10. Brooker, R.J. Genetics: Analysis and principles. Boston: McGraw Hill Companies, Inc; 2005.
11. Cook GC, Zumla, AI. Manson's Tropical Diseases. 22nd Edition. London: Saunders Elsevier; 2009:983-1004
12. Crevel, R. Van Ottenhoff, T. H. M., Van, J. W. M., Crevel, R. Van, Ottenhoff, T. H. M., Meer, J. W. M. Van Der. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):294.
13. Duo, D. Jurnal TB dan HIV. Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis. Jakarta: Indonesia; 2004.
14. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic' S. Recombinant bacillus Calmette – Gue´rin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13853–13858.
15. Fairbanks, D. F., W. R. Andersen. *Genetics: continuity of life*. New York: Brooks/Cole Publishing Company; 1999.
16. Gani A. Metode Bakteriologi Diagnostik. Makassar: Balai Besar Laboratorium Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan.; 2008:98-99.
17. Ilangumaran, S.N.P. Narayan, S., Ramu, G. Cellular and humoral immune responses to recombinant 65-kD antigen of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and healthy controls. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:79-85.
18. Kardjito, T.V.M. Host defense against tuberculosis. Naskah Lengkap Seminar Nasional Tuberkulosis dan Lepra. Yogyakarta: Pusat Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada; 1996.
19. Kreiswirth, B. N., Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsin, B., Driscoll, J. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3200.
20. Kalantri SP, Pai M, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systemic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:59-62.
21. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004. 120:418-28.
22. McClean. 1997. Cloning and molecular analysis of genes. Available from : <http://www.ndsu.edu/pubweb/cloning.htm> [Accessed 03/07/13]
23. Palomino, JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J.* 2005;26:339-50.
24. Paoletta, P. Introduction to molecular biology. Boston: McGraw-hill Companies, Inc; 1998.
25. Reece, RJ. Analysis of Gene and Genome. England: John Wiley & Sons, Ltd; 2004.
26. Sambrook, J.S., D.W. Russel. Molecular cloning : A Laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
27. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol.* 2003;16(3):463–496.
28. Sudjadi. Bioteknologi Kesehatan. Yogyakarta: Kanisius; 2008.
29. Cole S. T., R. Brosch., J. Parkhill., T. Garnier., C. Churcher., D. Harris., S. V. Gordon., K. Eiglmeier., S. Gas., C. E. Barry III., F. Tekaia., K. Badcock., D. Basham., D. Brown., T. Chillingworth., R. Connor., R. Davies., K. Devlin., T. Feltwell., S. Gentles., N. Hamlin., S. Holroyd., T. Hornsby., K. Jagels., A. Krogh., J. McLean., S. Moule., L. Murphy., K. Oliver., J. Osborne., M. A. Quail., M.-A. Rajandream., J. Rogers., S. Rutter., K. Seeger., J. Skelton., R. Squares., S. Squares., J. E. Sulston., K. Taylor.,

- S. Whitehead & B. G. Barrell. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-544.
30. Todar, K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. Wisconsin: Department of Bacteriology; 2005.
 31. Prasad TS, Verma R, Kumar S, Nirujogi RS, Sathé GJ, Madugundu AK, Sharma J, Puttamallesh VN, Ganjiwale A, Myneedu VP, Chatterjee A, Pandey A, Harsha H, Narayana J. Proteomic analysis of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Proteomics*. 2013;10:8.
 32. Weaver, R.F. *Molecular Biology*. 3rd ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education, Inc; 2005.
 33. Wiker, H. G., Harboe, M., Groups, M., Mycobacterial, O. F. The Antigen 85 Complex: a Major Secretion Product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological*. 1992;56(4):648–661.
 34. Wong, D.W.S. *The ABC of gene cloning*. New York: International Thomson Publishing; 1997.
 35. World Health Organization. *Anti Tuberculosis Drug Resistance In The World*. 3th Global Report. Geneva: WHO; 2004.
 36. Zvi, A., Ariel, N., Fulkerson, J., Sadoff, J. C., and Shafferman, A. 2008. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomics*. 2008;25:1-25.

PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP PROFIL LIPID dan KADAR NO_x TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) DISLIPIDEMIA

Dewi Wiryanthini IA¹, Sutadarma IWG¹, Yuliana²

¹Bagian Biokimia, ²Bagian Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Jln PB Sudirman Denpasar

E-mail: dew_wiryanthini@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Dislipidemia adalah kelainan metabolisme lipid yang ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total, *Low Density Lipoprotein* (LDL), trigliserida dan penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) yang mengakibatkan penurunan enzim antioksidan dan memicu terjadinya stres oksidatif, ditandai salah satunya dengan peningkatan peroksidasi lipid. Stres oksidatif menyebabkan menurunnya kadar nitrat dan nitrit (NO_x) darah sebagai metabolit antara *nitric oxide* (NO). Ekstrak biji kakao kaya akan kandungan antioksidan *flavanols* yang terdiri dari *catechin*, *epicatechin* dan *procyanidin*.

Metode: Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental *Pretest-Posttest Control Group Design*.

Hasil: Penelitian menunjukkan bahwa setelah pemberian ekstrak biji kakao terjadi penurunan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL pada kelompok P1, P2 dan P3 yang bermakna (p=0,000), peningkatan kadar HDL yang bermakna pada kelompok P1, P2 dan P3 (p=0,000) serta peningkatan kadar NO_x yang tidak bermakna pada kelompok P1, P2 dan P3 (p=0,486).

Kesimpulan: Ekstrak biji kakao dapat menghambat stres oksidatif yang ditandai dengan penurunan secara bermakna kadar kolesterol total, trigliserida, LDL disertai peningkatan secara bermakna kadar HDL, namun belum mampu memperbaiki kadar NO_x darah tikus dalam keadaan dislipidemia.

Kata kunci: ekstrak biji kakao, dislipidemia, profil lipid, NO_x

PENDAHULUAN

Kejadian penyakit kardiovaskuler yang sering mengakibatkan kematian saat ini sudah banyak terjadi di negara berkembang seperti di Indonesia. Penyakit kardiovaskuler tidak hanya menyerang pada usia lanjut namun semakin banyak orang usia muda yang mengidapnya. Hal ini didukung oleh data Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2004, bahwa sebanyak 2,2% penduduk Indonesia usia 15 tahun atau lebih menderita penyakit kardiovaskuler.¹

Penyakit jantung koroner (PJK) merupakan penyakit kardiovaskuler yang menyebabkan kematian terbesar, disebabkan gangguan aliran darah ke otot jantung karena terjadi penyempitan pembuluh darah jantung dan aterosklerosis akibat dislipidemia.² Dislipidemia merupakan kelainan metabolisme lipid ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total, trigliserida, *Low Density Lipoprotein* (LDL) serta penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL), menyebabkan terjadi penurunan enzim antioksidan dan peningkatan peroksidasi lipid,

yang berperan pada proses terjadinya aterosklerosis.³ Penelitian pada tikus menunjukkan terjadi induksi prooksidan dan peningkatan peroksidasi lipid pada tikus yang mendapat diet tinggi kolesterol.⁴

Dislipidemia adalah suatu keadaan yang meliputi kenaikan kadar kolesterol total, LDL, trigliserida, dan atau penurunan kadar HDL. Pada tikus kadar normal kolesterol total tikus adalah 10-54 mg/dL⁵, kadar normal trigliserida tikus adalah 26-145 mg/dL.⁶ Kenaikan kolesterol umumnya dicapai dalam waktu 2 minggu, dikatakan dislipidemia bila terjadi kenaikan berat badan > 20% atau kadar kolesterol total serum > 240 mg/dL.⁷

Sejumlah studi telah dilakukan untuk mengevaluasi efek berbagai antioksidan terhadap stres oksidatif dan profil lipid. Suplementasi vitamin E secara signifikan dapat menurunkan peroksidasi lipid dan peningkatan status antioksidan total dalam plasma.⁸ Suplementasi jus sayuran dapat menurunkan kadar trigliserida, rasio HDL/LDL darah dan senyawa malondialdehid (MDA), serta dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan serum seperti glutathione peroksidase dan superoksid dismutase.⁹ Penelitian epidemiologi menunjukkan makanan tinggi beta karoten dan vitamin E menurunkan resiko aterosklerosis dengan cara mencegah oksidasi LDL. Efek beta karoten dan zeaxanthin menjaga liposome dari peroksidasi lipid.¹⁰ Peningkatan stres oksidatif sebanding dengan penurunan mekanisme antioksidan serta peningkatan akumulasi produk *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan disfungsi endotel,¹¹ yang ditandai dengan penurunan kadar *Nitric oxide* (NO).¹²

Nitric oxide merupakan *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) untuk relaksasi otot polos pembuluh darah, yang mengakibatkan vasodilatasi pembuluh darah dan meningkatkan aliran darah.¹³ NO di dalam jaringan dibentuk oleh *L-arginine* dibantu

enzim *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) dengan kofaktor NADPH, oksigen (O₂), dan *tetrahydrobiopterin* (BH₄) menghasilkan *L-citrulline* serta nitrat dan nitrit sebagai metabolit antara.^{14,15} NO yang tidak digunakan dioksidasi menjadi nitrit, jika NO diperlukan kembali, nitrit dalam jaringan direduksi menjadi NO dikatalisis oleh enzim *xanthine oxidase* (XO). Kadar nitrat dan nitrit dalam darah relatif stabil, sehingga total kadar nitrit dan nitrat serum (NO_x) dipakai sebagai indikator sintesis NO tubuh.¹⁵

Biji kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu sumber antioksidan alami yang banyak dibudidayakan di Indonesia serta memiliki harga jual yang relatif terjangkau. Biji kakao atau coklat merupakan sumber bahan makanan yang kaya kandungan antioksidan flavonoid. Jenis flavonoid yang terdapat adalah monomer flavan-3-ol (*flavanols*) meliputi *epicatechin* dan *catechin*, serta oligomer *flavanols* yaitu *procyanidin*. Konsumsi makanan yang kaya kandungan flavonoidnya telah terbukti memiliki manfaat untuk kesehatan jantung dan pembuluh darah.¹⁶ Kandungan *flavanols* pada biji kakao secara kualitatif sangat bervariasi tergantung sumber dan proses fermentasinya namun secara kuantitatif berbeda disebabkan oleh perbedaan iklim tempat tumbuhnya tanaman kakao.¹⁷

Manfaat biji kakao telah banyak diteliti, namun khasiatnya dalam mengatasi keadaan stres oksidatif yang diakibatkan oleh dislipidemia masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, terutama biji kakao yang bersumber dari daerah Bali. Oleh karena itu penelitian ini ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap profil lipid dan NO_x darah tikus jantan dislipidemia.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain *pre and*

post test control group design. Waktu penelitian selama 3 bulan yang berlangsung mulai bulan Juni 2012 sampai dengan Agustus 2012. Tempat penelitian adalah di Bagian Farmakologi dan Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

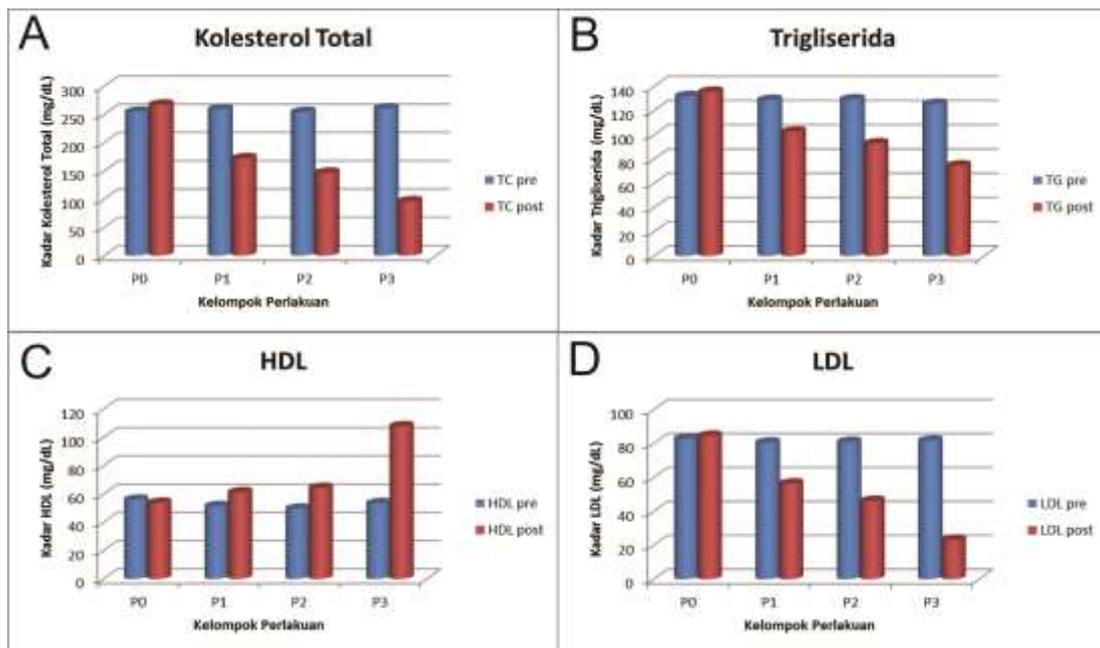
Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Wistar* yang berumur 4-5 bulan yang diperoleh dari *Animal Laboratory Unit* (ALU) Bagian Farmakologi FK Unud. Besar sampel ditentukan dengan rumus Pocock, masing-masing kelompok 5 ekor dengan berat badan 180-200 gram.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji kakao, variabel tergantungan adalah kadar profil lipid darah dan NOx darah, variabel kendali adalah jenis kelamin, kesehatan, berat badan, makanan, umur dan lingkungan. Semua tikus diberikan makanan tinggi kolesterol selama 21 hari, kemudian dilakukan *pre-test*. Kemudian tikus dislipidemia dibagi secara acak sederhana menjadi 4 kelompok dan tetap diberikan makanan tinggi kolesterol, kelompok control P0, kelompok perlakuan P1 diberikan ekstrak biji kakao 70 mg per ekor per hari, P2

diberikan 140 mg dan P3 diberikan 280 mg selama 14 hari. Setelah 14 hari, dilakukan pengambilan darah melalui medial canthus sinus orbitalis untuk pemeriksaan profil lipid dan pemeriksaan NOx darah. Makanan tinggi kolesterol adalah campuran khusus yang diperoleh dari Bagian Farmakologi FK Unud.

Ekstrak biji kakao adalah hasil ekstraksi dari biji kakao kering yang telah dikupas kulit bijinya. Biji kakao diblender sampai halus, 500 gram bubuk kakao dimaserasi menggunakan etanol 96% selama 48 jam, lalu diuapkan menggunakan evaporator sampai dihasilkan ekstrak biji kakao dan siap digunakan untuk penelitian. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik dari Komite Etik Litbang FK Unud/RSUP Sanglah.

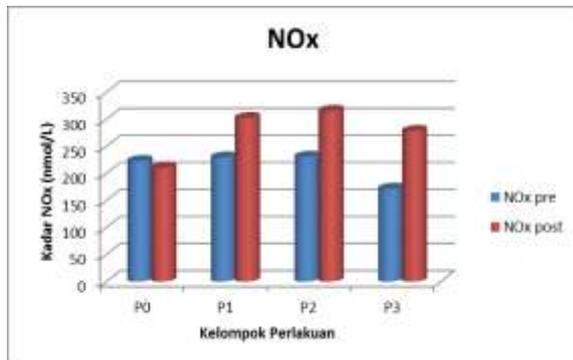
Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dengan derajat signifikansi ditetapkan dengan nilai $p < 0,05$.



Gambar 1. Kadar Kolesterol Total (A), Trigliserida (B), HDL (C) dan LDL (D) sebelum dan setelah pemberian ekstrak biji kakao dengan tiga variasi dosis

HASIL

Hasil penelitian yang meliputi pemeriksaan profil lipid dan kadar NOx darah dapat dilihat pada **gambar 1** dan **2**.



Gambar 2. Kadar NOx sebelum dan setelah pemberian ekstrak biji kakao dengan tiga variasi dosis

Pada **Gambar 2** disajikan hasil pemeriksaan pre-test berupa kadar NOx antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak biji kakao P1, P2 dan P3 tidak ada perbedaan secara statistik ($P=0,577$). Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa hasil pemeriksaan NOx setelah perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($P=0,486$). Pada kelompok kontrol yaitu kelompok yang diberikan makanan tinggi kolesterol selama lima minggu tanpa ekstrak biji kakao pada kadar NOx tidak mengalami perubahan sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 kadar NOx mengalami peningkatan namun tidak bermakna secara statistik.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao memiliki efek hipolipidemic namun tidak dapat meningkatkan kadar NOx. Hasil pemeriksaan profil lipid dalam penelitian ini menunjukkan kemampuan ekstrak biji kakao memperbaiki profil lipid dalam batas normal. Kolesterol

total pada kelompok kontrol setelah diberikan makanan tinggi kolesterol selama lima minggu tetap tinggi dari 254,39 mg/dl menjadi 267,03 mg/dl. Sedangkan pada kelompok perlakuan mengalami penurunan terutama pada kelompok P3 (260,39 mg/dl menjadi 95,99 mg/dl). Penurunan kolesterol total pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bermakna secara statistik ($P=0,000$), hal yang serupa terjadi pada variabel trigliserida dan LDL. Untuk HDL berlaku sebaliknya yaitu terjadi peningkatan kadar HDL pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 secara bermakna ($P=0,000$) sedangkan pada kelompok kontrol tidak mengalami perubahan. Kandungan flavonoid yang cukup tinggi pada biji kakao¹⁶ mampu menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL dan meningkatkan HDL. Hasil penelitian ini sesuai dengan pemberian bubuk kakao pada tikus hiperkolesterolemia yang menunjukkan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL dan MDA disertai peningkatan HDL.¹⁸

Antioksidan *flavanols* yang terdapat pada ekstrak biji kakao bekerja di membran sel dengan menangkap radikal bebas yang terbentuk di membran sel. Mekanisme kerja *flavanols* pada membran sel menetralkan radikal bebas asam lemak tidak jenuh (*peroxyl polyunsaturated fatty acid*) atau PUFA-OO• pada membran *phospholipid* sel dan mengubahnya menjadi *hydroperoxy polyunsaturated fatty acid* (PUFA-OOH) yang tidak lagi bersifat radikal bebas, sehingga oksidasi lipid membran sel menurun.¹⁹ Hasil penelitian ini juga sesuai dengan beberapa penelitian lain seperti pemberian ekstrak biji kedelai hitam yang mengandung antosianin dapat memperbaiki profil lipid, karena dapat menurunkan kolesterol total dan trigliserida secara bermakna dan meningkatkan HDL.²⁰ Ekstrak air daun ubijalar ungu menunjukkan fungsi hipolipidemic pada tikus yang diberikan makanan tinggi kolesterol ditandai

dengan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL dan peningkatan kadar HDL.²¹

Terdapat peningkatan kadar NOx plasma yang secara statistik tidak berbeda bermakna sebelum dan setelah intervensi pada masing-masing kelompok. Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Murphy dkk yaitu pemberian bubuk kakao yang mengandung 897 mg *flavanols* setelah 6 jam memiliki efek yang sama dengan pemberian bubuk kakao yang mengandung 234 mg *flavanols* selama 4 minggu, yaitu sama-sama menghambat aktivisasi dan fungsi platelet sehingga dapat mencegah terjadinya plak aterosklerosis. Hal ini dimungkinkan oleh NO teroksidasi menjadi nitrat dan nitrit.²²

SIMPULAN

Ekstrak biji kakao dapat mencegah terjadinya dislipidemia ditandai dengan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL disertai peningkatan kadar HDL, namun belum efektif untuk meningkatkan kadar NOx untuk mencegah terjadinya disfungsi endotel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada Litbang FK Unud atas bantuannya memberikan dana penelitian sehingga penelitian ini dapat dikerjakan sebagaimana mestinya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Profil Kesehatan Indonesia 2005. Jakarta: Departemen Kesehatan Indonesia; 2007.
2. Mayes PA, and Botham, KM. Lipids of Physiologic Significance. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, and Rodwell VW (editors). Harper's Illustrated Biochemistry. 26th. Ed. New York: McGraw Hill. 2003;111-121.
3. Kaviarasan K, Arjunan MM, and Pugalendi KV. Lipid Profile, Oxidant-antioxidant Status and Glycoprotein Components in Hyperlipidemic Patients With/without Diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 2005;362:49-56.
4. Vecera R, *et.al*. Antioxidant Status, Lipoprotein Profile and Liver Lipids in Rats Fed on High-Cholesterol Diet Containing Currant Oil Rich in n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Physiol. Res*. 2003;52:177-187.
5. Kusumawati D. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 2004;42 – 43.
6. Nichols JL. *The Laboratory Rat*. Florida Atlantic University. 2003. [cited: 7 Januari 2010]. Available from: <http://www.fau.edu/research/ovs/VetData/rat.php>.
7. Sunarsih ES, and Prasetyastuti. Pengaruh Pemberian Juice Lidah Buaya terhadap Kadar Lipid Peroksida (MDA) Pada Tikus Jantan Hiperlipidemia. *Majalah Obat Tradisional*. 2008;45(13):145-152.
8. Mortzavimoghaddam SG, Zarban A, and Rezvani M. The Effect Of Vitamin E Supplementation On Lipid Profile And Oxidative Stress Markers In Hemodialysis Patients. *ARYA Atherosclerosis Journal*. 2007;3(3):139-142.
9. Jiyeon K, Yeon KS, MinSook L, and HongSeok Ahn. Effect of vegetable juice supplementation on serum lipid profile and antioxidant activity in college women. *Korean Journal of Community Nutrition*. 2005;10(2):183-188
10. McNulty.A. Differential Effects of Carotenoids on Lipid Peroxidation due to Membrane Interactions:X-rays Diffraction Analysis. *Biochimica etBiophysica Acta*. 2007;1768:167-74.
11. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant Activities and Oxidative Stress By Products in Human Hypertension. *Hypertension*. 2003; 41:1096-1101.
12. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennet WA, Khalil RA. Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension*. 2001;38(2):718-722.
13. Ceriello A. Possible Role of Oxidative Stress in The Pathogenesis of Hypertension. *Diabetes Care*. 2008;31(2): S181-S184.

14. R&D Systems. Nitric Oxide Synthases. 2000 [diakses 3 Juni 2011]; Diunduh dari : http://rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR00_NOS.aspx
15. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:915-22.
16. Mao TK, Van De Water J, Keen CL, Schitz HH, Gershwin ME. Cocoa Flavanols and Procyanidins Promote Transforming Growth Factor- β_1 Homeostasis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Exp Biol Med.* 2003;228:93-9.
17. Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Ndoumou DO, dan Lieberei R. Original Article : Comparative Study of Different Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Clones In Terms Of Their Phenolics and Anthocyanins Contents. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2006;19:612-619.
18. Lecumberri E, *et al.* Basic Nutritional Investigation : A Diet Rich In Dietary Fiber From Cocoa Improves Lipid Profile and Reduces Malondialdehyde in Hypercholesterolemic Rats. *Nutrition.* 2007;23:332-341.
19. Bender DA, and Mayes PA. Vitamins and Minerals. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, and Rodwel VW (editors). *Harper's Illustrated Biochemistry.* 26th. Ed. New York: McGraw Hill. 2003;481-497.
20. Kwon SH. Anti-obesity and Hypolipidemic Effects of Black Soybean Anthocyanins. *Journal of Medicinal Food.* 2007;10(3):552-6.
21. Sumardika IW, Jawi IM. Ekstrak Air Daun Ubijalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina.* 2012;43:67-71.
22. Murphy KJ. *et al.* Diet Containing Cocoa Powder With Flavanols and procyanidins Inhibits platelet function. *Proceedings of The Nutrition Society of Australia.* 2001;25:S79.

EFEK KUERSETIN TERHADAP EKSPRESI GEN *ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE* (eNos) DI SEL OTOT JANTUNG DAN SEL ENDOTELIAL AORTA TIKUS DIABETES MELITUS TIPE 2

Tien¹, Ahmad Hamim Sadewa², Arta Farmawati²

¹Fakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo,

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

E-mail: tiensyamsuddin@yahoo.com

A B S T R A K

Latar Belakang: Keadaan hiperglikemia dapat mempengaruhi ekspresi berbagai gen yang berhubungan dengan atherogenesis dan angiogenesis. Salah satunya adalah ekspresi gen *endothelial nitric oxide synthase* (eNos). Penurunan ekspresi gen eNos pada sel endotelial menyebabkan kardiovaskular aterosklerotik pada diabetes melitus (DM) dan perubahan fenotif sel-sel otot jantung. Kuersetin merupakan senyawa flavonoid fitoestrogen yang banyak ditemukan dalam diet manusia dan digunakan dalam memperbaiki disfungsi vaskular. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kuersetin berperan dalam memperbaiki fungsi kardiovaskular.

Metode: Dalam penelitian ini digunakan 36 ekor tikus Wistar jantan usia 8-10 minggu yang dibagi ke dalam 9 kelompok (4 ekor/kelompok). Tikus diinjeksi *streptozotocin* 60 mg/kgBB dan *nicotinamide* 120 mg/kgBB untuk induksi DM tipe 2. Kuersetin diberikan secara oral selama 4 minggu dengan dosis yang bervariasi 5, 20, dan 80 mg/kgBB/hari, serta dosis kombinasi dengan glibenklamid 5 mg/kgBB/hari. Pemeriksaan ekspresi gen eNOS di sel otot jantung dan sel endotelial aorta dilakukan menggunakan metode *immunohistochemistry* (IHC).

Hasil: Terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen eNos pada sel otot jantung dan sel endotelial aorta ($p < 0,05$). Tingkat ekspresi gen di sel endotelial aorta ($97,56 \pm 2,224\%$) lebih tinggi dibanding sel otot jantung ($91,87 \pm 5,082\%$). Terdapat korelasi yang bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta yaitu semakin tinggi dosis kuersetin maka tingkat ekspresi gen eNos juga semakin tinggi, sedangkan di sel otot jantung tidak terdapat korelasi dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos.

Kesimpulan: Terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta dan sel otot jantung. Terdapat korelasi bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta tikus DM tipe 2, sedangkan pada sel otot jantung tidak terdapat korelasi bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos.

Kata Kunci: *Endothelial nitric oxide synthase* (eNos), kuersetin, sel endotelial aorta, sel otot jantung, Diabetes melitus tipe 2.

PENDAHULUAN

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi abnormal yang pertama kali menandai diabetes melitus (DM). Endotelium adalah sensor yang cukup sensitif terhadap peningkatan glukosa darah dan dapat

mengalami perubahan fungsi dengan cepat. Respon terhadap hiperglikemia ini terjadi hanya dalam waktu 6 jam.¹ Perubahan fungsional yang begitu cepat ini menunjukkan bahwa endotelium merupakan indikator awal terjadinya diabetik vaskular pada DM.²

Hiperglikemia kronis juga dapat mempengaruhi ekspresi berbagai gen yang berhubungan dengan aterosclerosis dan angiogenesis³. Salah satunya adalah ekspresi gen *endothelial nitric oxide synthase* (eNos). Penurunan ekspresi gen eNos pada sel endotelial menyebabkan kardiovaskular aterosklerotik pada DM dan perubahan fenotip sel-sel otot jantung⁴, serta menginduksi perubahan jumlah kalsium dan *nitric oxide* (NO), serta menurunkan fungsi miokardial.⁵

Senyawa NO adalah regulator yang penting terhadap fungsi kardiovaskular dan memodulasi kerja sel-sel otot jantung. Senyawa NO dihasilkan dari konversi L-arginin menjadi L-sitruilin melalui mekanisme enzimatik oleh *nitric oxide synthase* (NOS). Aktivitas NOS sangat tergantung pada *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH), kalmodulin, *flavin adenine dinucleotide* (FAD), *flavin adenine mononucleotide* (FMN), dan tetrahidrobiopterin sebagai kofaktor⁶. Gen eNos diekspresikan oleh sel endokardial, sel endotelial, sel epitelial ginjal, *myocytes* atrial, dan ventrikular jantung.^{7,8}

Penurunan produksi NO dapat disebabkan oleh gangguan ekspresi eNos, modifikasi post-translasi eNos, adanya interaksi dengan *heat shock protein 90* (hsp90), dan kaveolin⁹. Penelitian efek iskemia miokardial jantung tikus terhadap ekspresi gen eNos menunjukkan pada 30 menit pertama ekspresi gen eNos masih stabil, setelah 60 menit terjadi penurunan ekspresi eNos sebesar 77% , dan setelah 120 menit ekspresi gen eNos tidak terdeteksi¹⁰.

Berbagai agen farmakologi telah dikembangkan untuk meningkatkan fungsi kardiovaskular pada DM. Flavonoid merupakan senyawa fitoestrogen yang banyak digunakan dalam memperbaiki disfungsi vaskular. Salah satu senyawa flavonoid yang

banyak ditemukan dalam diet manusia seperti apel dan bawang adalah kuersetin^{11,12}. Promotor eNos terdiri atas sejumlah elemen regulator ekspresi gen eNos, salah satu diantaranya adalah *estrogen-responsive element*. Pengikatan estrogen pada reseptor estrogen menyebabkan aktivasi *estrogen-responsive element* dan peningkatan transkripsi gen eNos¹³. Kuersetin sebagai senyawa fitoestrogen juga memiliki efek seperti estrogen dalam mengaktivasi *estrogen-responsive element*¹⁴.

Pemberian kuersetin sebagai antioksidan yang kuat mendampingi obat antidiabetik diharapkan dapat memberikan wacana baru penggunaan senyawa flavonoid dalam penatalaksanaan DM, khususnya diabetik vaskular dan kardiomiopati. Oleh karena itu, perlu adanya pemeriksaan efek kuersetin terhadap marker fungsi kardiovaskular seperti ekspresi eNos di jantung dan aorta DM tipe 2 dengan berbagai variasi dosis kuersetin.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah *Streptozotocin* dan *nicotinamide* (*Sigma Chemical*), Antibodi mouse monoklonal NOS3 (A-9) 200 µl (*Santa Cruz*), Kit glukosa *glucose oxidase-phenol aminophenazone* (GOD-PAP) (*DiaSys Diagnostic Systems*), padatan kuersetin (*Sigma Chemical*).

Induksi Diabetes Melitus dengan STZ-NA

Hewan coba yang digunakan adalah tikus Wistar jantan sebanyak 36 ekor dengan usia 8-10 minggu dan berat 200-300 g serta dilakukan adaptasi selama 3 hari sebelum diinduksi dengan DM tipe 2. Setelah adaptasi hewan dicoba dipuasakan selama 12 jam (*overnight*). Setelah 12 jam, diukur kadar glukosa darah puasa. Tikus diinjeksi STZ secara i.p (*intraperitoneal*) dengan dosis 60

mg/kg BB yang dilarutkan dalam 3 mL *buffer* sitrat pH 4,5 dingin. Setelah 15 menit pemberian STZ, tikus diinjeksi NA secara i.p dengan dosis 120 mg/kg BB yang dilarutkan dalam 3 mL larutan NaCl 0,9%.

Dalam penentuan kondisi DM, kadar glukosa darah puasa diperiksa pada hari ke-7 setelah penyuntikan STZ-NA. Kadar glukosa darah puasa diukur dengan metode GOD-PAP menggunakan spektrofotometer. Tikus dinyatakan diabetes apabila setelah 1 minggu kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL.¹⁵

Perlakuan Hewan Coba

Kuersetin dan glibenklamid diberikan kepada 8 kelompok setiap hari selama 28 hari per-sondase¹⁶. Dosis yang diberikan glibenklamid 5 mg/kg BB (K3), kuersetin 5 mg/kg BB (K4), kuersetin 20 mg/kg BB (K5), kuersetin 80 mg/kg BB (K6), kuersetin 5 mg/kg BB dan glibenklamid 5 mg/kg BB (K7), kuersetin 20 mg/kg BB dan glibenklamid 5 mg/kg BB (K8), dan kuersetin 80 mg/kg BB dan glibenklamid 5 mg/kg BB (K9). Kuersetin diberikan dalam 2 ml Na-CMC 0,5% untuk semua perlakuan. Untuk kelompok sehat (K1) dan DM tanpa perlakuan (K2) diberikan larutan *vehicle* Na-CMC 0,5% tanpa kuersetin.

Glukosa darah puasa diukur pada hari ke-21 pemberian kuersetin untuk mengontrol efek kuersetin. Setelah 35 hari pemberian kuersetin, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa, dekapitasi, dan pemeriksaan *immunohistochemistry* (IHC) jaringan jantung dan aorta.

Pemeriksaan Kadar Glukosa Plasma

Darah diambil dari sinus orbital tikus dan disentrifugasi segera setelah pengambilan darah. Glukosa diukur menggunakan kit glukosa dari Dysis.

Pemeriksaan Imunohistokimia

Setelah 4 minggu perlakuan, tikus dikorbankan, jaringan jantung dan aorta diambil dan dimasukkan ke dalam bufer formalin 10%, kemudian diblok parafin. Ekspresi eNos diperiksa dengan metode imunohistokimia. Imunohistokimia jaringan dilakukan menggunakan teknik standar *streptavidin-biotin-labeling*. Irisan otot skelet dan hepar dideparafinisasi menggunakan xylol. Rehidrasi dalam larutan alkohol absolut (100%) kemudian alkohol 90%, 80% and 70%. dan dibilas dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Jaringan ditambah dengan H₂O₂ dan diinkubasi selama 10 menit di dalam microwave (90° C) untuk memblok aktivitas *indigenous peroxidase* kemudian dibilas selama 15 menit dalam larutan 0.01 M PBS (pH 7.40). Jaringan kemudian diblok dengan *universal tracking antibody* (antibodi primer eNos) dan *Horse Radish Peroxidase* (HRP). Pewarnaan menggunakan betazoid DAB dan *counter stain hematoxylin meyer* yang ditambahkan setelah inkubasi selama 1 jam.

Analisis Statistik

Data disajikan secara deskriptif dalam bentuk naratif, tabular, dan grafikal. Normalitas sebaran data diperiksa dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* ($n \leq 50$). Data ditampilkan sebagai rerata \pm simpang baku. Uji statistik parametrik untuk data numerikal (distribusi data normal) dilakukan dengan menggunakan *One Way ANOVA*. Namun jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan uji statistik nonparametrik yang merupakan alternatif dari uji parametriknya. Untuk alternatif uji *One Way ANOVA* adalah uji *Kruskal-Wallis*. Untuk uji korelasi digunakan uji korelasi *Pearson* jika distribusi data normal, namun jika distribusi data tidak normal dilakukan uji nonparametrik

Spearman. Nilai $p < 0,05$ digunakan sebagai signifikansi pada setiap uji.

HASIL

Berat Badan

Berat badan tikus ditimbang sebanyak 2 kali yaitu sebelum perlakuan (*pretest*) dan 4 minggu setelah perlakuan (*posttest*). Rerata BB tikus dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Uji normalitas berat badan subjek dengan *Saphiro-Wilk* ($n < 50$) menunjukkan adanya distribusi yang normal pada setiap kelompok pada saat *pretest* dan *posttest* ($p > 0,05$). Hasil uji *One Way ANOVA* memperlihatkan tidak terdapat perbedaan berat badan yang bermakna antar kelompok baik pada saat *pretest* maupun *posttest* ($p > 0,05$).

Tabel 1. Rerata berat badan pada saat *pretest* dan *posttest* (gram)

Kelompok (n=4)	<i>Pretest</i>	<i>Posttest</i>	p*
Normal (K1)	217±12,193	225,25±30,977	0,613
Diabetes (K2)	212±7,071	222,5±25,981	0,457
DM + Glibenklamid (K3)	211,5±6,557	190,75±22,824	0,157
DM + Kuesetin 5 (K4)	202,25±23,543	215,25±25,395	0,064
DM + Kuesetin 20 (K5)	227,5±26,913	204,25±71,602	0,377
DM + Kuesetin 80 (K6)	229±11,747	229,25±47,961	0,990
DM + Glibenklamid dan kuesetin 5 (K7)	203±10,985	195,50±24,772	0,464
DM + Glibenklamid dan kuesetin 20 (K8)	211,25±28,64	211,5±58,089	0,990
DM + Glibenklamid dan kuesetin 80 (K9)	189,75±9,069	170,5±4,655	0,005
p**	0,078	0,520	

Ket. * Uji t berpasangan, ** Uji *One Way ANOVA*, $p < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

Kadar Glukosa Darah Puasa

Analisis statistik uji normalitas menunjukkan setiap kelompok memiliki distribusi yang normal baik *pretest* maupun *posttest* ($p > 0,05$). Hasil uji t berpasangan

memperlihatkan K1 dan K8 memiliki perbedaan rerata kadar glukosa darah puasa yang bermakna ($p < 0,05$), sedangkan kelompok lain tidak bermakna.

Tabel 2. Rerata kadar glukosa darah puasa pada saat *pretest* dan *posttest*(mg/dL)

Kelompok (n=4)	<i>Pretest</i>	<i>Posttest</i>	p*
Normal (K1)	108,04±36,58	62,87±11,88	0,047
Diabetes (K2)	154,25±16,60	196,74±103,13	0,444
DM + Glibenklamid (K3)	202,25±62,23	143,08±127,99	0,535
DM + Kuesetin 5 (K4)	143,33±15,81	143,29±15,86	0,272
DM + Kuesetin 20 (K5)	150,75±21,71	179,38±102,12	0,635
DM + Kuesetin 80 (K6)	172,46±38,90	164,80±62,14	0,621
DM + Glibenklamid dan kuesetin 5 (K7)	290,07±78,16	165,14±47,47	0,139
DM + Glibenklamid dan kuesetin 20 (K8)	260,04±104,59	105,47±54,23	0,014
DM + Glibenklamid dan kuesetin 80 (K9)	374,39±144,25	232,31±90,10	0,149
p**	0,000	0,013	

Ket. * Uji t berpasangan, ** Uji *One Way ANOVA*, $p < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

Berdasarkan uji *Levene's test* antar kelompok memiliki variansi data yang sama ($p>0,05$), sehingga digunakan *One Way ANOVA* untuk menguji perbedaan rerata kadar glukosa darah puasa antar kelompok baik pada saat *pretest* maupun *posttest*. Uji *One Way ANOVA* memperlihatkan terdapat perbedaan kadar glukosa darah puasa yang bermakna

antar kelompok baik pada saat *pretest* maupun *posttest* ($p<0,05$).

Tingkat Ekspresi Gen eNos di Sel Otot Jantung

Rerata persentase tingkat ekspresi gen eNos pada sel otot jantung dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Rerata persentase tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung (%)

Kelompok (n=4)	Rerata±SD	p*
Normal (K1)	89,61±3,225	0,055
Diabetes (K2)	97,26±1,588	
DM + Glibenklamid (K3)	96,39±1,160	
DM + Kuersetin 5 (K4)	89,53±1,767	
DM + Kuersetin 20 (K5)	91,92±4,556	
DM + Kuersetin 80 (K6)	88,35±3,949	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 5 (K7)	92,60±7,530	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 20 (K8)	94,17±3,521	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 80 (K9)	86,98±6,492	

Ket. *Uji *One Way ANOVA*, $p>0,05$ menunjukkan hasil yang tidak bermakna

Uji *One Way ANOVA* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung antar kelompok. ($p>0,05$).

Tingkat Ekspresi Gen eNos di Sel Endotelial Aorta

Tingkat ekspresi gen eNos antar kelompok dianalisis menggunakan uji *One*

Way ANOVA dengan signifikansi $p<0,05$. Hasil analisis menunjukkan tidak terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen eNos yang bermakna antar kelompok ($p>0,05$). Distribusi data tingkat ekspresi gen eNos pada setiap kelompok menunjukkan sebaran yang normal ($p>0,05$).

Tabel 4. Rerata persentase tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta (%)

Kelompok (n=4)	Rerata±SD	p*
Normal (K1)	98,78±1,631	0,546
Diabetes (K2)	97,16±1,289	
DM + Glibenklamid (K3)	98,08±1,158	
DM + Kuersetin 5 (K4)	94,57±1,529	
DM + Kuersetin 20 (K5)	97,48±2,462	
DM + Kuersetin 80 (K6)	98,30±0,367	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 5 (K7)	97,79±2,291	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 20 (K8)	96,62±4,149	
DM + Glibenklamid dan kuersetin 80 (K9)	99,22±0,943	

Ket. *Uji *One Way ANOVA*, $p>0,05$ menunjukkan hasil yang tidak bermakna

Perbedaan Tingkat Ekspresi Gen eNos di Jantung dan Aorta

Berdasarkan uji *Wilcoxon* diperoleh hasil signifikansi $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang bermakna antara tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung dan sel endotelial aorta.

Tabel 5. Perbedaan tingkat ekspresi gen eNos di jantung dan aorta (%)

Jaringan	n	Median (minimum-maksimum)	Rerata±SD	p*
Aorta	36	98,19 (90,58-100)	97,56±2,224	0,000
Jantung	36	92,37 (81,21-100)	91,87±5,082	

Ket. * Uji *Wilcoxon*, $p < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

Korelasi Dosis Kuersetin dengan Tingkat Ekspresi Gen eNos di Jantung dan Aorta

Untuk melihat korelasi dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung dan sel endotelial aorta dilakukan dengan menggunakan uji korelasi *Spearman*. Hal ini karena dosis kuersetin memiliki sebaran data yang tidak normal ($p < 0,05$). Uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi (r), nilai signifikansi (p), dan arah korelasi.

Tabel 6. Korelasi dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung

		Tingkat ekspresi eNos
Dosis	r	-0,237
kuersetin	p	0,459
	n	12

Ket. Uji Korelasi *Spearman*, $P < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

Tabel 6 di atas menunjukkan nilai signifikansi *Spearman* $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat korelasi yang bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung. Koefisien korelasi (r) juga memperlihatkan arah korelasi negatif dengan kekuatan korelasi lemah ($r = -0,237$).

Terdapat 31 subjek yang memiliki tingkat ekspresi eNos di sel otot jantung lebih rendah dibanding di sel endotelial aorta dan terdapat 5 subjek yang memiliki tingkat ekspresi gen eNos lebih tinggi di sel otot jantung dibanding di sel endotelial aorta.

Tabel 7. Korelasi dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta

		Tingkat ekspresi eNos
Dosis	r	0,650
kuersetin	p	0,022
	n	12

Ket. Uji Korelasi *Spearman*, $P < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

Hasil uji korelasi *Spearman* terhadap dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta menunjukkan korelasi yang bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta ($p < 0,05$). Nilai koefisien korelasi (r) *Spearman* sebesar 0,650 menunjukkan arah korelasi positif dengan kekuatan korelasi kuat.

PEMBAHASAN

Berat Badan

Berdasarkan uji t berpasangan dan *One Way ANOVA*, rerata berat badan tikus pada saat *pretest* dan *posttest* menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna, kecuali untuk kelompok glibenklamid dan kuersetin 80 mg/kgBB (K9). Hal ini juga dapat dilihat pada kadar glukosa darah puasa (GDP), dimana kadar GDP K9 setelah perlakuan 4

minggu menunjukkan nilai >200 mg/dL. Pada kelompok yang diberi kuersetin (K4, K5, K6) tidak menunjukkan kenaikan ataupun penurunan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa kuersetin tidak memberikan efek terhadap perubahan berat badan tikus. Pemberian kuersetin 10 mg/kgBB pada tikus yang diinduksi diabetes tidak menunjukkan hasil yang signifikan terhadap berat badan tikus.¹⁷

Kelompok kombinasi glibenklamid dan kuersetin menunjukkan kecenderungan terjadinya penurunan berat badan, meskipun hasilnya tidak signifikan. Demikian pula untuk kelompok yang diberi glibenklamid 5 mg/kgBB terjadi penurunan berat badan. Glibenklamid tidak menyebabkan peningkatan berat badan pada tikus diabetes. Tikus normal memiliki berat badan yang lebih tinggi di banding tikus diabetes dan tikus diabetes yang diberi glibenklamid.¹⁸

Kadar Glukosa Darah Puasa

Pada penelitian ini kelompok tikus DM yang mengalami penurunan kadar GDP hingga mencapai kadar glukosa normal adalah kelompok tikus DM yang diberi kombinasi glibenklamid dan kuersetin 20 mg/kgBB (K8) yaitu $260,04 \pm 104,585$ mg/dL pada saat *pretest* menjadi $105,47 \pm 54,237$ mg/dL pada saat *posttest*. Hasil uji t berpasangan pada kelompok ini menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kadar GDP *pretest* dan *posttest*.

Secara keseluruhan kadar GDP untuk tikus yang diberi glibenklamid baik kombinasi dengan kuersetin maupun dosis tunggal memperlihatkan adanya penurunan kadar glukosa darah, meski hasilnya tidak semua signifikan seperti pada K8. Untuk kelompok tikus DM yang diberi kuersetin dengan dosis tunggal yaitu 5, 20, dan 80 mg/kgBB menunjukkan hasil yang bervariasi dengan kecenderungan GDP yang konstan. Sebuah

penelitian menemukan bahwa dosis kuersetin 25 mg/kgBB yang diberikan selama 4 minggu pada tikus diabetes memberikan penurunan kadar glukosa darah yang tidak signifikan.¹⁹

Rerata kadar GDP menunjukkan bahwa kuersetin tidak memberikan efek secara langsung terhadap penurunan kadar glukosa darah pada diabetes melitus. Kuersetin sebagai senyawa flavonoid lebih memiliki efek antioksidan yang kuat dibanding antihiperglikemia.²⁰ Hal ini terlihat dari kadar GDP, kelompok dengan dosis kuersetin tunggal memiliki kadar GDP yang cenderung konstan pada saat *pretest* dan *posttest*. Sedangkan kelompok yang diberi glibenklamid baik dosis kombinasi maupun dosis tunggal memberikan penurunan kadar GDP meskipun tidak semua hasilnya bermakna. Glibenklamida merupakan senyawa sulfonilurea yang banyak digunakan dalam penatalaksanaan diabetes melitus tipe 2. Senyawa ini menutup kanal K-ATPase, menghasilkan depolarisasi membran, dan meningkatkan *influx* kalsium ke dalam sel, sehingga memicu sekresi insulin ke dalam darah.²¹

Tingkat Ekspresi Gen eNos di Sel Otot Jantung

Ekspresi gen eNos terutama dihasilkan di sel endotelial aorta, namun beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa eNos juga dihasilkan pada beberapa sel diantaranya adalah sel otot jantung (*cardiomyocytes*). Peranan eNos di sel otot jantung adalah untuk meningkatkan relaksasi diastolik otot jantung melalui aktivitas fisiologis senyawa vasodilator *nitric oxide* (NO).²²

Tingkat ekspresi gen eNos pada sel otot jantung tidak menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna antar kelompok. Dosis kuersetin 20 mg/kgBB/hari memberikan rerata tingkat ekspresi yang lebih tinggi dibanding dosis lain baik pada kelompok yang diberi

kuersetin dengan dosis tunggal maupun dosis kombinasi. Tingkat ekspresi gen eNos pada kelompok diabetes menunjukkan hasil yang lebih tinggi di banding normal, meski hasilnya tidak signifikan. Penelitian lain juga menemukan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi mRNA eNos yang bermakna antara tikus sehat dan diabetes.²³

Tingkat Ekspresi Gen eNos di Sel Endotelial Aorta

Berdasarkan rerata tingkat ekspresi gen eNos terlihat bahwa semakin tinggi dosis kuersetin semakin tinggi pula tingkat ekspresi eNos meskipun hasilnya tidak signifikan. Kuersetin sebagai senyawa fitoestrogen memiliki aksi estrogen endogen yang berperan dalam meningkatkan transkripsi gen eNos melalui elemen regulator promoter gen eNos yaitu *estrogen-responsive element*.¹⁴

Pada tahap awal paparan hiperglikemia, sel yang pertama kali merespon adalah sel endotelial aorta.¹ Peningkatan ekspresi gen eNos dapat juga terjadi pada keadaan hiperglikemia. Penelitian pada kultur sel endotelial dengan kadar glukosa tinggi menunjukkan terjadi *up-regulation* gen eNos.²⁴ Tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta yang diperoleh dari hasil penelitian ini dapat juga dijelaskan melalui mekanisme paparan hiperglikemia selain disebabkan oleh aksi kuersetin. Durasi induksi DM yang berbeda-beda antar kelompok (1-3 minggu) dapat menjadi penyebab terjadinya paparan hiperglikemia kronis pada sel endotelial aorta sehingga memberikan tingkat ekspresi gen eNos yang tidak berbeda secara signifikan antara kelompok normal dengan kelompok DM.

Perbedaan Tingkat Ekspresi Gen eNos di Jantung dan Aorta

Berdasarkan rerata perbedaan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung dan sel

endotelial aorta terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna tingkat ekspresi gen eNos pada kedua sel ($p < 0,05$). Tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta ($97,56 \pm 2,224\%$) lebih tinggi dibanding di sel otot jantung ($91,87 \pm 5,082\%$). Untuk tikus diabetes (K2) tidak terdapat perbedaan tingkat ekspresi eNos. Penelitian pada ekspresi eNos di jantung dan aorta menyebutkan ekspresi mRNA eNos di jantung lebih tinggi dibanding di aorta pada tikus sehat dan tikus diabetes setelah 4 minggu terpapar hiperglikemia.²⁶

Sel endotelial aorta merupakan sel yang pertama kali terpapar oleh kadar glukosa darah yang tinggi. Pada keadaan hiperglikemia terjadi peningkatan jumlah radikal bebas yang memicu terjadinya stres oksidatif di tingkat seluler, sehingga ekspresi eNos juga mengalami peningkatan sebagai kompensasi untuk menurunkan tingkat stres oksidatif tersebut. Namun, jika terjadi hiperglikemia kronis ekspresi gen eNos justru mengalami penurunan. Selain itu, aktivitas eNos dalam menghasilkan senyawa vasodilator NO juga mengalami perubahan. Hal ini dapat menyebabkan kadar NO di sirkulasi mengalami penurunan.^{24,27}

Korelasi Dosis Kuersetin dengan Tingkat Ekspresi Gen eNos di Jantung dan Aorta

Berdasarkan uji korelasi Spearman terhadap dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung menunjukkan tidak adanya korelasi yang bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos dan arah korelasinya negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi gen eNos di sel otot jantung bukan diinduksi oleh kuersetin. Keadaan hiperglikemia dapat meng-upregulasi ekspresi gen eNos. Namun akibat durasi induksi DM yang berbeda-beda (1-3 minggu) menyebabkan terjadinya hiperglikemia kronis

yang kemudian menurunkan ekspresi gen eNos di sel otot jantung.

Hal yang berbeda diperoleh dari uji korelasi *Spearman* terhadap dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta menunjukkan adanya korelasi yang bermakna dengan arah korelasi positif. Sebuah penelitian menyatakan bahwa kuersetin mampu meningkatkan tingkat ekspresi gen eNos pada aorta tikus hipertensi.²⁸ Secara teori, kuersetin sebagai senyawa fitoestrogen memiliki aksi estrogen endogen yang berperan dalam meningkatkan transkripsi gen eNos melalui elemen regulator promoter gen eNos yaitu *estrogen-responsive element*.¹⁴ Kuersetin yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuersetin aglikan yang bersifat tidak larut air. Kuersetin dapat menembus membran plasma dan kemudian terikat pada reseptor estrogen yang berada pada permukaan membran inti. Pengikatan kuersetin pada reseptor estrogen akan mengaktifasi elemen regulator *estrogen-responsive element* pada promoter gen eNos yang kemudian meng-upregulasi ekspresi gen eNos.

SIMPULAN

Terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung dan sel endotelial aorta, tidak terdapat korelasi bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel otot jantung tikus DM tipe 2, terdapat korelasi bermakna antara dosis kuersetin dengan tingkat ekspresi gen eNos di sel endotelial aorta tikus DM tipe 2 yaitu semakin tinggi dosis kuersetin maka tingkat ekspresi gen eNos juga semakin tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah mendukung selesainya penelitian ini terutama *Health Professional Education Quality (HPEQ)*

Universitas Haluoleo atas dukungan dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001; 103(12): 1618-1623.
2. Joshua A, Beckman MD. Pathophysiology of Vascular Dysfunction in Diabetes. *Cardiology Rounds*. 2004;8(10).
3. Stenina OI. Regulation of vascular genes by glucose. *Curr Pharm Des*. 2005;11: 2367-2381.
4. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399: 601-605.
5. Malhotra A, Lopez C, Nazakouzi A. Troponin subunits contribute to altered myosin ATPase activity in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 1995; 151: 165-172.
6. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43: 109-142.
7. Lamas S, Marsden PA, LiGK, Tempst, P., Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U SA*. 1992; 89:6348-6352.
8. Balligand J-L, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 β and IFN- γ . *Am J Physiol*. 1995; 268:1293-1303.
9. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep*. 2003; 5: 473-480.
10. Giralde RR, Pandu A, Xia, Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the post-ischemic heart. *J Biol Chem*. 1997; 272: 21420-21426.
11. Nilsson S, Kela SM, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev*. 2001; 81(4): 1535-1565.
12. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II.

- Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 243-255.
13. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268: 17478-17488.
 14. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry.* 2004; 65: 995-1016.
 15. Barik R, Jain S, Qwatra D, Joshi A, Tripathi GS, Goyal R. Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Ichnocarpus frutescens* in streptozotocin-nicotinamide induce type-II diabetes in rats. *Indian J Pharmacol.* 2008; 40(1): 19-22.
 16. Czerny B, Put A, Mysliwiec Z, Juzyszyn Z. The influence of quercetin on some parameters of lipid metabolism in rats chronically exposed to ammonium fluoride. *Fluoride.* 2000; 33(1): 27-32.
 17. Machha A, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rats aortas. *Nitric oxide.* 2007; 16: 442-447.
 18. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MS, Gurtu S. Effect of Glibenclamide alone versus Glibenclamide and Honey on Oxidative Stress in Pancreas of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *IJARNP.* 2011; 4(2): 1-10.
 19. Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA. Protective Effect Of Quercetin On The Morphology Of Pancreatic β -Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Afr. J. Trad.* 2007; 4 (1): 64 – 74.
 20. Bronner C, Landry Y. Kinetics of inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Agents actions.* 1985; 16: 147-151.
 21. Gerich JE. Oral hypoglycemic agents. *N Engl J Med.* 1989; 321: 1231-1245.
 22. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1846-1858.
 23. Felaco M, Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Libertini N, Taccardi AA, Di Napoli P, Di Giulio C, Barbacane R, Conti P. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and localization in healthy and diabetic rat hearts. *Ann Clin Lab Sci.* 2001; 31(2): 179-186.
 24. Chen S, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. Pro-oxidant role of heme oxygenase in mediating glucose-induced endothelial cells damage. *Free Radic Res.* 2004; 38: 1301-1310.
 25. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher T. High Glucose Increases Nitric Oxide Synthase Expression and Superoxide Anion Generation in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation.* 1997; 96: 25-28.
 26. Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, Kusterer K, Zeuzem S. Antioxidative treatment reverses imbalance of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 16(3): 771-780.
 27. Farhangkhoe H, Khan ZA, Kaur H, Xin X, Chen S, Chakrabarti S. Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: Pathogenesis and potential treatment targets. *Pharmacol Ther.* 2006; 111: 384-399.
 28. Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J. *et al.* Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity, and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006; 24(1): 75-84.

GENOTIPE VIRUS HEPATITIS B (VHB) PADA PENDERITA HEMODIALISIS (HD) DENGAN HbsAg NEGATIF DI RSUD DR. SOETOMO, SURABAYA, INDONESIA

Retno Handajani^{1,3}, Lina Lukitasari^{1,3}, Mochamad Amin³,
Mochammad Thaha^{2,3}, Soetjipto^{1,3}

Departemen Biokimia Kedokteran¹, Departemen Penyakit Dalam², Fakultas Kedokteran dan *Institute of Tropical Disease*³, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

E-mail: retnohh@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Indonesia merupakan negara dengan endemisitas infeksi virus hepatitis B (VHB) sedang sampai tinggi. Infeksi VHB ditularkan secara parenteral dan penderita hemodialisis (HD) merupakan kelompok berisiko tertular infeksi VHB. Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan pemeriksaan molekuler yang dapat digunakan untuk deteksi dini asam nukleat organisme penyebab infeksi, sebelum petanda serologis muncul. Tujuan penelitian ini adalah menentukan genotipe VHB pada penderita HD dengan HbsAg negatif.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian *cross sectional*. Sampel serum diperoleh dari penderita HD di Unit Hemodialisis RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Deteksi *deoxy ribonucleic acid* (DNA) VHB dilakukan pada serum penderita HD dengan HbsAg negatif, selanjutnya dari hasil PCR VHB positif dilakukan sekuensing dan dianalisis untuk ditentukan genotipe VHB. Dari 50 serum penderita HD dalam penelitian ini diperoleh 96% (48/50) penderita dengan HbsAg yang negatif.

Hasil: Pemeriksaan PCR VHB pada 48 serum penderita HD dengan HbsAg negatif ini menunjukkan hasil positif sebanyak 12,5% (6/48). Analisis nukleotida hasil sekuensing enam DNA VHB positif ini menunjukkan semua HBV tersebut adalah genotipe B.

Simpulan: Dari penelitian ini dapat disimpulkan prosentasi HbsAg negatif dan DNA HBV positif pada penderita di Unit HD yang diteliti cukup tinggi dan semua VHB adalah genotipe B. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk penentuan subgenotipe VHB yang belum jelas subgenotipenya. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai tambahan bahan pertimbangan pengelolaan penderita di Unit HD.

Kata kunci: Virus Hepatitis B, Penderita Hemodialisis, HbsAg negatif, Genotipe VHB

PENDAHULUAN

Infeksi virus hepatitis B (VHB) masih menjadi masalah kesehatan di dunia termasuk di Indonesia. Dari tahun ke tahun, tetap banyak terdeteksi pengidap penderita infeksi kronik virus hepatitis B di seluruh dunia.^{1,2}

VHB dapat ditularkan secara parenteral melalui transfusi darah dan komponen darah, pemakaian jarum suntik atau alat yang tercemar VHB. Yang tergolong mempunyai risiko tinggi tertular VHB adalah mereka yang

menerima transfusi darah dan komponen darah berulang kali, penderita yang sedang menjalani hemodialisis (HD), penderita yang sering mendapatkan suntikan obat-obatan secara intra vena maupun petugas kesehatan yang banyak berhubungan dengan darah. Dikemukakan pula adanya penularan dalam keluarga.^{3,4,5} Jadi, penderita yang sedang menjalani HD merupakan salah satu kelompok penderita yang berisiko tinggi tertular infeksi VHB.

Deteksi terhadap infeksi VHB yang paling mudah adalah deteksi adanya antigen permukaan VHB (*surface antigen VHB = HbsAg*).⁶ Salah satu cara untuk mengetahui adanya DNA VHB yang beredar didalam darah, adalah deteksi *deoxy ribonucleic acid (DNA) VHB* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*⁷, dimana dengan teknik PCR ini dapat positif lebih cepat dibandingkan pemeriksaan antigen-antibodi dari serum dan untuk mengetahui genotipe VHB dilakukan *direct* sekuensing pada hasil PCR.²

Dengan PCR dan sekuensing nukleotida hasil PCR VHB yang positif, dapat diketahui genotipe VHB. Sampai saat ini diketahui adanya 10 genotipe VHB, yaitu genotipe A, B, C, D, E, F⁸, G⁹, H¹⁰, I¹¹ dan J¹², yang kemudian masih terbagi menjadi sub tipe, misalnya sub tipe B1, B2, B3 dan seterusnya. Genotipe VHB dan *precore-Core mutant* dilaporkan ikut berperan pada perjalanan infeksi VHB.^{13, 14, 15} Penentuan genotipe VHB berdasar sebagian dari daerah genom S memberikan hasil yang sama dengan penentuan genotipe berdasar seluruh nukleotida dari VHB.^{16,17} Dikemukakan bahwa genotipe pada VHC mempengaruhi perjalanan penyakit dan keberhasilan terapi.¹⁸

Dalam usaha peningkatan usaha penanganan dan pencegahan penyebaran infeksi VHB pada penderita yang sedang menjalani HD, serta untuk mengetahui apakah pada penderita yang sedang menjalani HD didapati VHB, perlu dilakukan pemeriksaan HbsAg yang dilanjutkan dengan deteksi DNA VHB dengan tehnik PCR pada kelompok penderita yang sedang menjalani HD dengan HbsAg negatif. Pada penelitian terdahulu telah kami lakukan pemeriksaan genotipe VHB pada penderita HD dengan HbsAg positif. Belum diketahui, seberapa banyakkah: HbsAg yang negatif pada penderita yang sedang menjalani HD dapat dideteksi DNA VHB dengan tehnik PCR dan bagaimanakah distribusi genotipe VHB tersebut.

Dengan mempertimbangkan berbagai hal tersebut diatas, maka perlu dilakukan penelitian ini, dengan tujuan: 1). Mendapatkan data HbsAg negatif pada penderita yang sedang menjalani HD; 2). Mendapatkan data DNA VHB positif dengan tehnik PCR pada penderita yang sedang menjalani hemodialisis dengan HbsAg negative dan 3). Mendapatkan data genotipe VHB pada penderita yang sedang menjalani HD dengan HbsAg negatif dan PCR VHB positif.

Diharapkan data yang diperoleh ini dapat dimanfaatkan sebagai pertimbangan lebih lanjut dalam pencegahan penularan VHB dan manajemen pengelolaan di Unit HD RSUD Dr Soetomo Surabaya pada khususnya dan di unit HD lain pada umumnya.

METODE

Penelitian ini merupakan *cross sectional study*. Lima puluh sampel darah diambil dari penderita yang sedang menjalani hemodialisis yang berobat di Poliklinik Ilmu Penyakit Dalam Unit Hemodialisis RSUD Dr. Soetomo Surabaya, setelah menanda tangani *informed consent*. Pemilihan sampel dilakukan oleh Dokter Ahli Penyakit Dalam yang bertugas di unit tersebut. Contoh darah yang telah diambil, ditempatkan dalam tabung pemusing steril tanpa anti-koagulan, kemudian dilakukan pemusingan untuk mendapatkan serumnya. Serum yang telah dipisah, dipindahkan kedalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80° C sampai saat pemeriksaan HBsAg dan DNA VHB dilakukan.

Pemeriksaan laboratorium dalam penelitian ini adalah pemeriksaan HBsAg, pemeriksaan DNA VHB dengan tehnik PCR dan sekuensing DNA VHB.

1. Pemeriksaan HBsAg :

HBsAg diperiksa dari serum darah dengan tehnik ELISA untuk mendeteksi

antigen VHB dalam serum. Digunakan kit AXIOM® dari Jerman sesuai petunjuk yang terlampir pada kit tersebut.

2. Pemeriksaan DNA VHB dengan tehnik PCR:

Pemeriksaan PCR disini ditujukan pada daerah *surface* VHB. Adapun tahap-tahap pemeriksaan PCR dalam penelitian ini adalah ekstraksi DNA VHB dari serum, reaksi amplifikasi dengan PCR dan elektroforesis.

a. Ekstraksi DNA VHB dari serum.

DNA VHB diekstraksi dari serum dengan cara ekstraksi menggunakan *DNAzol*. Pada setiap kali ekstraksi selalu disertakan kontrol negatif (digunakan akuades) dan kontrol positif

b. Reaksi amplifikasi dengan PCR.

Untuk reaksi amplifikasi DNA VHB ini , dilakukan PCR (bila perlu *nested*). Dalam reaksi PCR tahap I dan tahap II (bila perlu), digunakan Kit PCR *mixed* Fermentas®, primer VHB: P7 dan P8 pada PCR pertama¹⁶ dan primer VHB: HBS1 dan HBS2¹⁷ pada PCR kedua apabila diperlukan *nested PCR*. Primer P7, P8, HBS1 dan HBS2 sesuai dengan urutan nukleotida daerah *surface* VHB yang *conserved* dan sudah pernah dipublikasikan sebelumnya, sehingga dapat diharapkan tingkat keberhasilan PCR yang tinggi. Dengan primer ini juga dimungkinkan untuk diteruskan ke proses sekuensing untuk mengetahui genotipe VHB. PCR tahap pertama dan kedua masing-masing dikerjakan sebanyak 35 siklus dan digunakan suhu 94° C untuk denaturasi selama 1 menit, 50° C untuk annealing 1,5 menit serta 72° C untuk ekstensi selama 2 menit.

c. Elektroforesis

Pada setiap hasil amplifikasi DNA VHB dilakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa 2% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang mengandung *ethidium bromide*. DNA

VHB dari sampel-sampel, kontrol negatif (digunakan akuades), kontrol positif serta marka ($\text{Ø}x174/ \text{HaeIII}$ digest) yang sudah disepariasi dapat dilihat dibawah sinar ultraviolet. Untuk dokumentasi hasil, dilakukan pengambilan foto menggunakan kamera digital.

3. Sekuensing DNA VHB:

Tahap-tahap yang harus dilakukan pada proses sekuensing ini adalah purifikasi DNA VHB hasil PCR positif yang berisi fragmen-fragmen nukleotida daerah genom VHB yang dituju yang telah diamplifikasi, selanjutnya dilakukan purifikasi dan hasil purifikasi dicek dengan elektroforesis. Selanjutnya dilakukan *labeling* dengan teknik PCR menggunakan nukleotida trifosfat normal, *dye dideoxy* nukleotida trifosfat yang sudah dilabel dan salah satu primer yang dipakai dalam PCR sebelumnya. Hasil *labeling* dengan PCR dipurifikasi lagi dan sekuens nukleotida diketatahui dengan metoda *direct* sekuensing yang menggunakan mesin ABI 310 *Sequencer DNA* dari *Applied Biosystems, Inc.*

4. Analisis sekuens nukleotida

Pada analisis, DNA VHB yang diperoleh dari DNA VHB serum sampel penderita HD dengan HbsAg negatif dibandingkan dengan sekuens nukleotida dari genotipe VHB yang pernah dipublikasi sebelumnya, menggunakan komputer dengan program *Genetyx Ver.10*, untuk mengetahui genotipe VHB pada penderita tersebut.

HASIL

Dalam penelitian ini diperoleh dari 50 sampel sera yang berasal dari penderita HD di Unit HD RSUD Dr Soetomo. Rangkuman data jenis kelamin dan umur penderita yang sedang menjalani hemodialisis di RSUD Dr Soetomo ditampilkan pada tabel 1 tersebut di bawah.

Tabel 1. Jenis kelamin dan umur penderita

Jenis Kelamin	Jumlah Penderita	Kisaran Umur (Tahun)
Pria	34 (68%)	21 - 78
Wanita	16 (32%)	28 - 52
Total	50 (100%)	21 - 78

Lima puluh penderita yang sedang menjalani hemodialisis di RSUD Dr Soetomo dalam penelitian ini mempunyai kisaran umur 21 sampai dengan 78 tahun, terdiri dari 34 (tiga puluh empat) orang laki-laki dengan kisaran umur 21 tahun sampai dengan 78 tahun dan 16 (enam belas) orang perempuan dengan kisaran umur 28 tahun sampai dengan 52 tahun.

Pada ke 50 serum penderita tersebut semua diperiksa HbsAg, dimana didapatkan 2 (4%) serum penderita HD memberikan hasil yang positif dan 48 serum penderita HD memberikan hasil yang negative, artinya dalam penelitian ini 96% penderita HD mempunyai HbsAg negatif.

Selanjutnya pada 48 serum penderita HD yang memberikan hasil HbsAg negatif, dilakukan pemeriksaan PCR dengan menggunakan 2 pasang *primer*^{16,17} yang sudah disediakan. Hasil pemeriksaan sampel serum 48 penderita HD dengan HbsAg negatif adalah 6 (enam) (12,5%) memberi hasil pemeriksaan PCR VHB yang positif pada penggunaan pasangan *primer* P7 dan P8 serta pasangan *primer* HBS1 dan HBS2.

DNA VHB hasil amplifikasi PCR ini (dari hasil amplifikasi PCR menggunakan *primer* P7 dan P8 maupun pasangan *primer* HBS1 dan HBS2 pada 6 sampel penderita HD di RSUD Dr Soetomo selanjutnya dimurnikan dan diproses lebih lanjut untuk dilakukan *sequencing* dengan menggunakan cat *Big Dye* dan mesin *sequencer* ABI-310, sesuai prosedur yang telah dikemukakan. Dari hasil *sequencing* yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis molekuler untuk mengetahui genotipe VHB. Untuk mengetahui genotipe VHB, urutan nukleotida yang didapat pada penelitian ini

kemudian dibandingkan dengan urutan nukleotida yang sudah dipublikasi dan dibuat pohon *phylogenetic*.

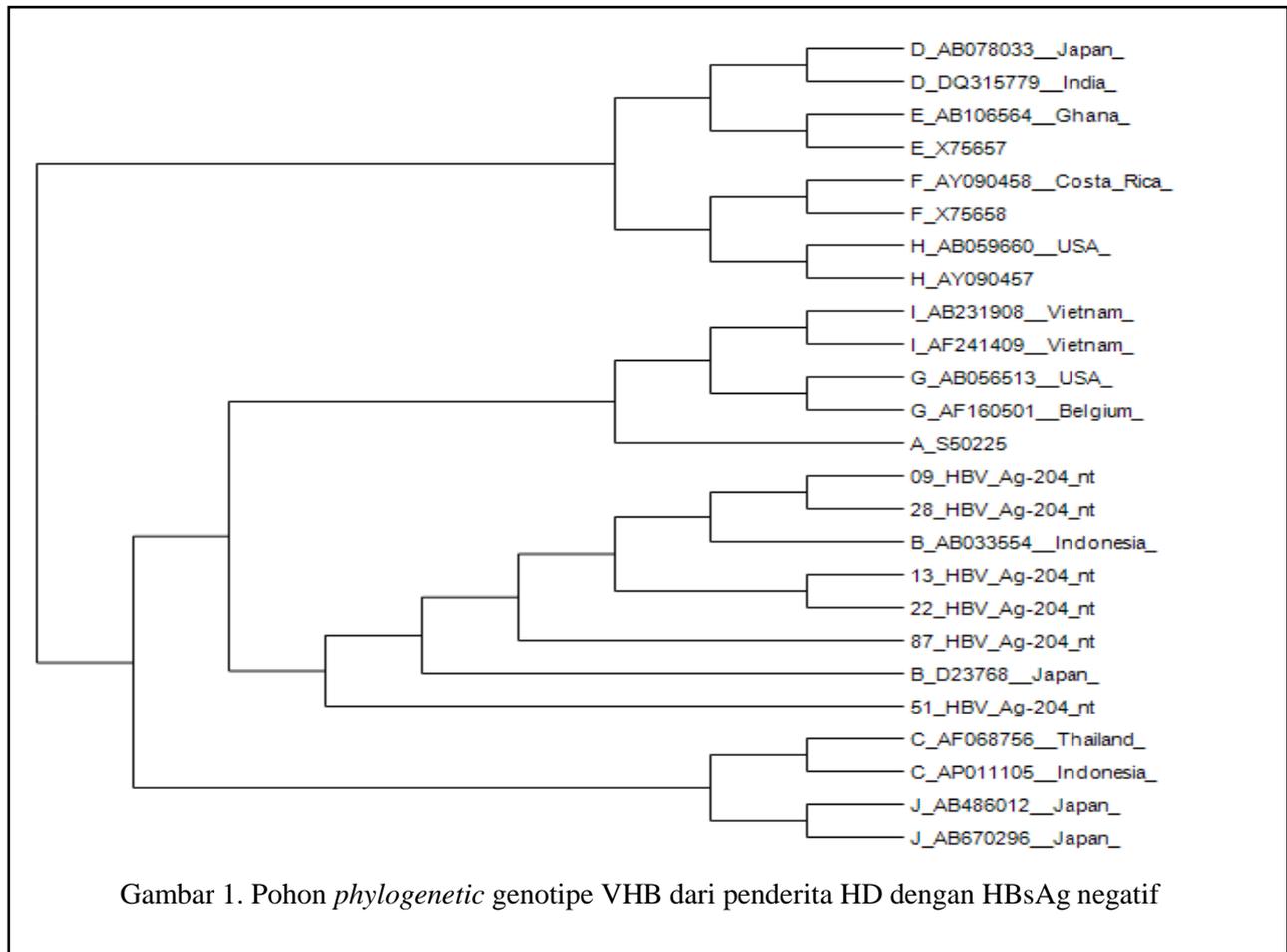
Pada hasil analisis molekuler dalam rangka menentukan genotipe VHB yang disusun dalam bentuk *multiple alignment* nukleotida sepanjang 204 dari 6 sampel hasil penelitian ini, bersama dengan genotipe VHB (A, B, C, D, E, F, G, H, I dan J) yang telah dipublikasikan, dibuat pohon *phylogenetic*. Dari hasil analisis nukleotida VHB dan pembuatan pohon *phylogenetic* dengan program komputer *Genetyx Ver 10*, maka ternyata VHB dari penderita HD dengan HbsAg negatif dalam penelitian ini (6 sampel) semua termasuk dalam kelompok VHB genotipe B. Pohon *phylogenetic* hasil penelitian ini ditampilkan pada Gambar 1.

PEMBAHASAN

Pada lima puluh penderita HD dalam penelitian ini, dimana penderita laki-laki (34 orang) lebih banyak dari penderita wanita (16), didapatkan lebih banyak penderita HD memberikan hasil HbsAg yang negatif (96%). Dikemukakan bahwa petanda serologis untuk infeksi VHB yang sedang aktif adalah adanya antigen dari daerah genom S (*surface*) VHB (HbsAg).⁶ Diberbagai unit HD, prosentasi HbsAg positif (maupun yang negatif) berbeda, kemungkinan dipengaruhi penanganan penderita atau endemisitas daerah tersebut. Di Khuzestan, Iran, dengan jumlah sampel penelitian sebanyak 204, diperoleh prosentasi HbsAg positif pada penderita HD sebanyak 5,1%¹⁹ dan ditahun 2011 dikota yang sama didapatkan DNA VHB positif pada penderita HD sebanyak 20%²⁰. Di Central Brasil, dari 15 Unit HD didapatkan HbsAg positif 29,8%²¹ dan ditahun 2009, dengan jumlah sampel penelitian sebanyak 781, di Brasilia diperoleh prosentasi HbsAg positif pada penderita HD sebanyak 3,3%.²² Dikemukakan bahwa pada

penderita HD menghadapi risiko tinggi tertular infeksi VHB karena adanya peluang terpapar infeksi VHB yang berhubungan dengan

prosedur dialisis dan penderita HD ini merupakan reservoir yang potent untuk menularkan infeksi VHB²⁰.



Untuk pemeriksaan PCR pada serum penderita HD yang memberikan hasil HbsAg negatif dalam penelitian ini digunakan 2 pasang *primer*^{16,17} yang sudah disediakan. Dikemukakan bahwa pemeriksaan adanya partikel VHB yang paling baik adalah dengan melakukan deteksi adanya DNA VHB dengan teknik PCR.^{23,24} Hasil pemeriksaan PCR positif pada penggunaan pasangan *primer* P7 dan P8 serta pasangan *primer* HBS1 dan HBS2 pada sampel serum penderita HD dengan HbsAg negatif ini cukup tinggi (12,5%). Pada sampel yang negatif pada penggunaan pasangan *primer* P7 dan P8, tetapi positif ketika dilakukan pemeriksaan *nested PCR* dengan menggunakan pasangan *primer* HBS1 dan

HBS2, dapat karena jumlah virus yang terlalu sedikit atau adanya perubahan/mutasi urutan nukleotida pada tempat melekat/*anneal primer* P7 dan P8, sehingga *primer* tidak bisa melekat/*anneal* yang berakibat hasil PCR yang negatif. Hasil PCR VHB yang positif dengan *primer* P7 dan P8 serta HBS1 dan HBS2 pada serum penderita HD dengan HbsAg negatif ini juga menunjukkan bahwa pemeriksaan PCR dapat memberikan hasil positif lebih dini dibandingkan pemeriksaan serologis.

Adanya genom VHB pada individu dengan HbsAg yang negatif disebut *occult HBV infection* (OBI). Status *occult HBV* ini pada beberapa kasus berhubungan dengan mutasi virus sehingga HbsAg tidak dapat

dideteksi, walaupun penyebab yang lebih sering adalah karena supresi yang kuat terhadap replikasi virus dan ekspresi gen, sehingga endahnya kadar VHB berakibat HbsAg berada dibawah batas deteksi. Dikemukakan juga bahwa pada sampel dengan HbsAg negatif dan PCR VHB positif ini dapat pula terjadi karena adanya mutasi pada gen S, sehingga HbsAg tidak dapat terdeteksi.²⁰ Dalam penelitiannya, Neisi (2011) mendapatkan *occult hepatitis B* 4% pada penderita HD yang menunjukkan ELISA VHB negatif. Status OBI didapatkan diseluruh dunia dengan prevalensi 0% sampai 36%, yang pada distribusinya merefleksikan prevalensi umum pada berbagai area geografi.²⁰

Dalam penelitian ini digunakan pasangan *primer* P7 dan P8 serta pasangan *primer* HBS1 dan HBS2. Pasangan *primer* P7 dan P8 ini merupakan pasangan *primer* yang apabila dipakai pada PCR dapat memberikan amplifikasi nukleotida yang positif, maka setelah dilakukan *sekuensing*, urutan nukleotida yang didapat akan dapat digunakan untuk mengetahui genotipe VHB.¹⁶ Demikian juga urutan nukleotida hasil PCR dengan *primer* HBS1 dan HBS2, dikemukakan dapat dipakai untuk penentuan genotipe VHB.^{17,2} Amplifikasi fragmen DNA VHB dengan PCR dalam penelitian ini menggunakan *primer* P7 dan P8, kalau hasil PCR VHB masih negatif, dilakukan *nested PCR* menggunakan pasangan *primer* HBS1 dan HBS2, adalah untuk menjangkit DNA positif yang lebih banyak. Hasil DNA VHB positif (12,5%) pada penderita HD dengan HbsAg negatif ini lebih tinggi dari yang telah dipublikasi Assarehdegan¹⁹, yaitu pada penderita HD dengan HbsAg negatif di propinsi Khuzestan - Iran, didapatkan DNA VHB positif sebanyak 8,33%. Namun perlu diingat pula bahwa hal ini sejalan dengan Indonesia termasuk negara dengan endemisitas infeksi VHB yang sedang sampai tinggi²⁵ dan seperti telah dikemukakan diatas, bahwa status OBI diseluruh dunia

merefleksikan prevalensi umum pada berbagai area geografi.²⁰

Mengingat hasil PCR dengan pasangan *primer* HBS1 dan HBS2 menghasilkan fragmen nukleotida yang lebih pendek, maka penentuan genotipe VHB dilakukan berdasar urutan nukleotida yang pendek. Telah dikemukakan di atas bahwa saat ini telah dipublikasikan adanya 10 genotipe VHB, yaitu VHB genotipe A, B, C, D, E, F⁸, G⁹, H¹⁰, I¹¹ dan J¹². VHB genotipe A umumnya didapatkan di Europe Tengah dan Utara, walaupun juga banyak didapatkan di Amerika Utara dan *sub-Saharan Afrika*. VHB genotipe B dan C di daerah Asia. VHB genotipe D didapatkan tersebar luas di berbagai negara, tetapi merupakan genotipe VHB yang menonjol di daerah Mediterranean. VHB genotipe E terutama didapatkan di Afrika Barat, sedangkan VHB genotipe F tersebar diantara berbagai genotipe VHB, dan merupakan genotipe VHB yang banyak ditemui pada penduduk asli di Amerika. VHB genotipe G ditemukan di USA dan Perancis, sedangkan VHB genotipe H banyak ditemukan di *Nicaragua, Mexico* dan *California*.¹⁰ Seperti telah dikemukakan sebelumnya, pada genotipe yang berbeda, divergensi nukleotida dari VHB sebanyak 8% atau lebih untuk seluruh sekuens VHB dan 4% pada tingkatan gen S.^{18,2}

Dari hasil analisis *phylogenetic* nukleotida VHB dalam penelitian ini maka ternyata VHB dari penderita HD dengan HbsAg negatif dalam penelitian ini (6 sampel) semua termasuk dalam kelompok VHB genotipe B, namun untuk sampel no 51 perlu diteliti lebih lanjut, mengingat terletak pada percabangan yang berbeda. Apakah memang hanya VHB genotipe B ataukah masih ada VHB genotipe lain pada penderita HD di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar. Dari publikasi terdahulu dikemukakan berbagai genotipe VHB pada *occult hepatitis* pada

penderita HD yang diperoleh dari berbagai negara, yaitu: VHB genotipe A di Yunani, D di Turki, A dan C di Itali, sedangkan A, B, dan C di Amerika Utara²⁰.

Hasil penelitian peneliti pada sampel VHB yang berasal dari penderita penyakit hati dari pulau Lombok juga hanya didapatkan VHB genotipe B.²⁶ Genotipe VHB selain B yang pernah ditemukan di Papua-Indonesia adalah genotipe C dan D.^{2, 27} Dikemukakan bahwa genotipe VHB ikut berperan pada perjalanan penyakit dan respon terhadap terapi.²⁰ Dari penelitian terdahulu dengan deteksi VHB dari donor darah sehat yang berasal dari Papua di Indonesia, dikemukakan adanya VHB genotipe B, C dan D, dimana VHB genotipe B dan C cukup banyak, namun VHB genotipe C sedikit lebih banyak dari pada VHB genotipe B di Indonesia.²

Hasil penelitian dari Taiwan pada penderita hepatitis kronis yang terinfeksi VHB, dikemukakan bahwa VHB genotipe B lebih banyak didapatkan dari pada VHB genotipe C, namun HbeAg positif pada VHB genotipe C lebih banyak daripada HbeAg positif pada VHB genotipe B dan VHB genotipe C mempunyai tampilan yang lebih agresif, sehingga lebih mengarah ke penyakit hati yang lebih progresif.²⁸ Pada penelitiannya yang lain di Taiwan pada donor darah, Kao juga mendapatkan bahwa donor darah sehat yang terinfeksi VHB, VHB genotipe B merupakan genotipe terbanyak, tetapi VHB genotipe C mempunyai kadar DNA VHB dalam serum yang lebih tinggi dari pada donor darah sehat yang terinfeksi VHB genotipe B.²⁹

SIMPULAN

Simpulan penelitian dengan judul Genotipe Virus Hepatitis B (HBV) pada Penderita Hemodialisis (HD) dengan HbsAg Negatif di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, Indonesia. adalah pada penderita HD dalam penelitian ini didapatkan:

1. Data HbsAg yang negatif sebanyak 96%.
2. Data DNA VHB positif sebanyak 12,5% pada penderita HD dengan HbsAg negatif.
3. Genotipe VHB pada penderita HD dengan HbsAg negatif dan DNA VHB positif, semua adalah genotipe B.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan:

1. Untuk mendapatkan data prevalensi HbsAg yang negatif dan genotipe VHB yang lebih bervariasi pada penderita HD sebagai populasi berisiko tinggi tertular VHB di Surabaya, Indonesia, perlu dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih banyak.
2. Untuk dimanfaatkan untuk tambahan pertimbangan pada pengelolaan penderita HD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada pemerintah Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Nasronudin, dr, SpPD, KPTI Direktur *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga yang telah mengizinkan peneliti menggunakan semua peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini, segenap sejawat di Unit Hemodialisis Poliklinik Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan semua pihak lain yang telah berkenan membantu sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amirudin R, Akil H, Akahane Y, and Suzuki H. Hepatitis B and C virus infection in Ujung Pandang, Indonesia. *Gastroenterol.* 1991;26 (Suppl.3):184-188.
2. Lusida MI, Nugrahaputra VE, Soetjpto, Handajani R, Fujii MN, Sasayama M, Utsumi T, and Hotta H. Novel Subgenotypes of Hepatitis B Virus Genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J.C.M.* 2008;46:2160-2166.
3. Muljono DH, Rahardja H, Soemarto R, dkk.

- Profil serologis virus hepatitis B dan C di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Acta Med Indones.* 1993;2:389-400.
4. Feitelson MA. Biology of Disease: Biology of Hepatitis B Virus Variants. 1994;71(3):324 - 349.
 5. Hou J, Liu Z, and Gu F. Epidemiology and prevention of Hepatitis B Virus infection. *Int J Med Sci.* 2005;2:50-57.
 6. Bonino F. Chronic Hepatitis B. The role of interferons in chronic viral hepatitis. Switzerland: F. Hoffman-La Roche Ltd., 1992.
 7. Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *NEJM.* 1997;337(24):1733-1752.
 8. Norder H, Courcouce AM, and Magnius LO. Complete Genomes, Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. *Virology.* 1994;198:489-503.
 9. Kidd-Ljunggren, K, Miyakawa Y and Kidd AH. Genetic Variability in Hepatitis B Viruses. *J Gen Virol.* 2002;83:1267-1280.
 10. Arauz-Ruiz PH, Norder BH, Robertson and Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002;83:2059-2073.
 11. Arankalle VA, Gandhe SS, Borkakoty BJ, Walimbe AM, Biswas D, Mahanta J. A Novel Recombinant (Genotype I) Similar to Vietnam/Laos in a Primitive Tribe in Eastern India. *J Virol Hepatol.* 2010;10: 1365-2893.
 12. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sughauci F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami, M. A Genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and genotypes isolated from a Japanese patients and provisionally assigned to new genotype. *J. Virol.* 2009;83;20:10538-10547
 13. Ehata T, Omata M, Chuang WL, Yokosuka O, Ito Y, Hosoda K, and Ohto M. Mutations in Core Nucleotide Sequence of Hepatitis B Virus Correlate with Fulminant and Severe Hepatitis. *J Clin Invest.* 1993;91: 1206-1213.
 14. Hsu HY, Chang MH, Lee CY, Hsien KH, Ni YH, Chen PJ, and Chen DS. Precore Mutant of Hepatitis B Virus in Childhood Fulminant Hepatitis B: An Infrequent Association. *J Inf Dis.* 1995;171:776-81.
 15. Hou J, Liu Z, and Gu F. Epidemiology and prevention of Hepatitis B Virus infection. *Int J Med Sci.* 2005;50-57.
 16. Lindh M, Anderson AS, and Gusdal A. Genotypes, nt 1858 Variants, and Geographic Origin of Hepatitis B Virus Large-Scale Analysis Using a New Genotyping Method. *J Inf Dis.* 1997;175:1285-93.
 17. Telenta PFS, Poggio GP, Lopez JL, Gonzales J, Lemberg A, and Campos RH. 1997. Increased Prevalence of Genotype F Hepatitis B Virus Isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol.* 1997; p.1873-1875.
 18. Kramvis A, Michael K, Guido F. Review Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine.* 2005;23: 2409-2423.
 19. Assarehdagan AM, Shakerinejad G, Noroozkohnejad R, Amini A, Rezaee SAR. Renal Data from Asia Africa. Prevalence of Hepatitis B and HCV Genotypes, among Hemodialysis Patients in Khuzestan Province, Southwest Iran. *Saudi J. Kidney Dis Transpl.* 2009;20(4):681-684.
 20. Neisi N, Makvandi M, Samarbaaf-Zadeh AR. A study on genotypes of hepatitis B virus among hemodialysis patients in Khuzestan province. *Jundishapur J Microbiol.* 2011; 4;2: 65-70.
 21. Ferreira RC, Teles SA, Dias MA, Tavares VR, Silva SA, Gomes SA, Yoshida CFT, Martins RMB. Hepatitis B Virus Infection Profile In Hemodialysis Patients in Central Brazil: Prevalence, Risk Factors, and Genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2006;101(6):689-692.
 22. Ana CC de Albuquerque, Maria RCD, Coêlh, Lemos MF, Ana MR, Cruz, Suellen CM, Moreira, BRC. Hepatitis B Virus Infection Profile in Different Hemodialysis Units in Recife, Pernambuco, Brazil. *Virus Rev Res.* 2009;14,Nr. 1
 23. Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *NEJM.* 1997;337 (24):1733-1752.
 24. Vyas GN. and Yen TSB. Hepatitis B Virus. In: Specter, S. *Viral Hepatitis. Diagnosis, Therapy and Prevention.* Humana Press, Totowa, New Jersey; 1999: 35 -63.
 25. Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B and Okamoto H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. *J Gastroenterol Hepatol.* 1991;6:491-498.
 26. Handajani R, Soewignjo S, Soetjipto, Lusida MI, Genotype VHB dan Analisis Molekuler Mutasi Berbagai Daerah Genom Virus Hepatitis B pada Penderita Hepatitis Kronis Sebelum dan Sesudah Setahun Terapi Lamivudin. Dalam : *Biologi Molekuler Penyakit Infeksi.* Editor Nasronudin, Lusida MI, Widiyanti P, Aksono EB, Rahardjo D, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, 2008
 27. Utsumi T, Lusida MI, Yano Y, Nugrahaputra

- VE, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hayashi Y and Hotta H. Complete Genome Sequence and Phylogenetic Relatedness of Hepatitis B Virus Isolates in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6):1842–1847
28. Kao JH, PJ Chen,, MY Lai, and DS Chen. Genotypes and Clinical Phenotypes of Hepatitis B Virus in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *J Clin Microbiol.* 2002a;40(4):1207-1209.
29. Kao JH, PJ Chen,, MY Lai, and DS Chen. Clinical and Virological Aspects of Blood Donors Infected with Hepatitis B Virus Genotypes B and C. *J Clin Microbiol.* 2002b;40(1):22-25.

ANALISIS POLIMORFISME -2578*C/A GENA VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A (VEGF-A) DENGAN TEKNIK ARMS-PCR PADA INDIVIDU DENGAN DAN TANPA ULKUS DIABETIKA

Ika Rahayu¹, Hemi Sinorita², Kris Herawan Timotius³, Ahmad Hamim Sadewa⁴

¹Kedokteran Molekuler, Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Universitas Gadjah Mada

²Bagian Endokrinologi, Departemen Penyakit Dalam, Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito

³Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Krida Wacana

⁴Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

E-mail: euodia.ika@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: *Amplification Refractory Mutation System- Polymerase Chain Reaction* (ARMS-PCR) mempunyai nama lain *allele-specific polymerase chain reaction* (ASP) dan *polymerase chain reaction amplification of specific alleles* (PASA). Metode ini dapat digunakan untuk mengamati beberapa titik mutasi pada polimorfisme yang melibatkan perubahan basa tunggal. Sistem ini merupakan sistem yang sederhana, dapat dipercaya dan *non-isotopic*. Perbedaan antara alel homozigot dan heterozigot pada suatu lokus dapat terlihat dengan jelas. Sebanyak 12-25% individu dengan diabetes melitus berisiko mengalami ulkus diabetika. Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) merupakan salah satu kelompok platelet-derived growth factor (PDGF) yang mempunyai peran potensial dalam angiogenesis. Polimorfisme gen VEGF-A -2578*C/A merupakan kandidat penyebab berkembangnya ulkus diabetika. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen VEGF-A pada pasien diabetes melitus dengan dan tanpa ulkus diabetika dengan teknik ARMS-PCR.

Metode: Penelitian ini merupakan studi kasus-kontrol. Teknik ARMS-PCR digunakan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen VEGF-A -2578*C/A. Polimerisasi DNA dengan teknik ini memerlukan tiga macam primer, yaitu: primer mutan, primer normal dan primer generik. Optimasi suhu untuk *annealing* dilakukan pada suhu 59°C, 60°C, 61°, 62° dan 63°C.

Hasil: Suhu *annealing* optimal yang didapatkan adalah 60°C. Genotiping dengan teknik ARMS-PCR memperlihatkan tiga genotip, yaitu CC, CA dan AA. Genotip CC merupakan homozigot normal, Genotip CA merupakan heterozigot mutan, dan Genotip AA merupakan homozigot mutan. Frekuensi genotip polimorfisme gen VEGF-A -2578*C/A tidak berbeda signifikan antara kelompok kontrol dan kasus.

Simpulan: Teknik ARMS-PCR merupakan teknik yang sederhana dan mudah untuk mengetahui adanya polimorfisme VEGF-A -2578*C/A pada individu diabetes melitus dengan dan tanpa ulkus diabetika.

Kata kunci: ARMS-PCR, ulkus diabetika, VEGF-A, polimorfisme -2578*C/A, diabetes melitus tipe 2.

PENDAHULUAN

Amplification Refractory Mutation System- Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) sering disebut dengan nama *allele-specific polymerase chain reaction (ASP)* dan *polymerase chain reaction amplification of specific alleles (PASA)*.¹ Metode ARMS-PCR pertama kali didemonstrasikan oleh Newton *et al.* (1989). Sistem ini dapat digunakan untuk mengamati beberapa titik mutasi pada polimorfisme yang melibatkan perubahan basa tunggal. Sistem ini memperlihatkan perbedaan yang jelas antara alel homozigot dan heterozigot pada suatu lokus. Sistem ini dapat digunakan untuk mendeteksi alel heterozigot, mendeteksi mutasi yang berhubungan dengan penyakit dan polimorfisme. Teknik ARMS-PCR menggunakan primer PCR yang spesifik terhadap *sequence* dan amplifikasi DNA terjadi jika alel target terdapat didalam DNA sampel.²

Jumlah penderita diabetes melitus (DM) di Indonesia pada tahun 2000 sejumlah 8,4 juta orang dan diperkirakan akan meningkat menjadi 21,3 juta jiwa pada tahun 2030.³ Sebanyak 12-25% pasien DM berisiko terhadap berkembangnya ulkus diabetika. Hal ini disebabkan oleh penyakit pembuluh darah perifer, neuropati autonomik dan neuropati perifer pada kaki.⁴ Kurangnya efektivitas sel dalam melawan mikroba juga menyebabkan infeksi semakin berkembang.⁵ Ulkus diabetika merupakan salah satu komplikasi yang sering terjadi pada pasien DM tipe 1 dan 2.⁶

Diabetes melitus merupakan suatu model prototopikal pada kejadian gangguan penyembuhan luka.⁷ Pasien DM menunjukkan kemampuan angiogenesis abnormal pada beberapa organ.⁸ Gen *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* merupakan gen yang

menyandi polipeptida VEGF. *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (sering disebut VEGF) mampu menginduksi angiogenesis dan dapat merangsang terbentuknya faktor jaringan protein trombogenik.^{7,9} Proses penyembuhan luka dapat terganggu jika angiogenesis tidak cukup.¹⁰

Polimorfisme -2578*C/A gen VEGF-A merupakan salah satu polimorfisme yang terjadi di daerah promotor *5'untranslated region (UTR)*.¹¹ Polimorfisme -2578*C/A gen VEGF-A diduga akan mempengaruhi ekspresi protein VEGF-A dan mengganggu proses penyembuhan luka.⁷

Peluang yang besar bagi pasien DM untuk berkembang menjadi ulkus diabetika perlu dicegah, oleh karena itu diperlukan metode diagnosa secara dini untuk mengetahui potensi pembawa sifat berkembangnya ulkus diabetika didalam tubuh. Pada penelitian ini kami ingin mengembangkan tehnik yang mudah, sederhana dan dapat dipercaya dalam melakukan analisis polimorfisme -2578*C/A gen VEGF-A pada individu dengan dan tanpa ulkus diabetika di Jawa.

METODE

Subjek

Penelitian ini menggunakan desain kasus-kontrol. Kelompok kasus adalah penderita DM tipe 2 dengan ulkus diabetika (n=20), kelompok kontrol adalah penderita DM tipe 2 tanpa ulkus diabetika (n=25). Subjek merupakan pasien di RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta dan Puskesmas Cawas II, Klaten. Kriteria inklusi yang digunakan adalah Pria atau wanita usia 30-65 tahun. Subjek telah didiagnosa menderita DM tipe 2 dan ulkus diabetika berdasarkan pemeriksaan secara fisik dengan kriteria *Grading system*

yang ditetapkan oleh Wagner pada tahun 1983. Durasi DM tipe 2 minimal 5 tahun, Suku Jawa untuk 3 generasi keatas dan bersedia menjadi subjek penelitian dengan menandatangani *informed consent*. Subjek kontrol mempunyai kriteria yang sama tetapi tidak pernah mengalami ulkus diabetika.

Isolasi DNA

DNA diisolasi dari *whole blood*. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan

Tianamp blood DNA kit dari Tiangen. DNA hasil isolasi disimpan dalam almari pendingin dengan suhu -20°C .

Pemeriksaan polimorfisme -2578*C/A gena VEGF-A dengan ARMS-PCR

Teknik ARMS-PCR digunakan untuk mengetahui adanya polimorfisme -2578*C/A gena VEGF-A dan digunakan lima primer (Tabel 1) berdasarkan pemeriksaan yang telah dilakukan oleh Amoli *et al.*¹²

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA

	<i>Primer sequence</i>
<i>Generic forward primer</i>	5'-TTAGGACACCATACCGATGG-3'
<i>C anti- sense primer</i>	5'-TCTGATTATCCACCCAGATCG-3'
<i>A anti- sense primer</i>	5'-TCTGATTATCCACCCAGATCT-3'
<i>Forward (beta actin)</i>	5'-CTTCCTTCTGGGCATGGAG-3'
<i>Reverse (beta actin)</i>	5'-TGGAGGGGCCGGACTCGTCA-3'

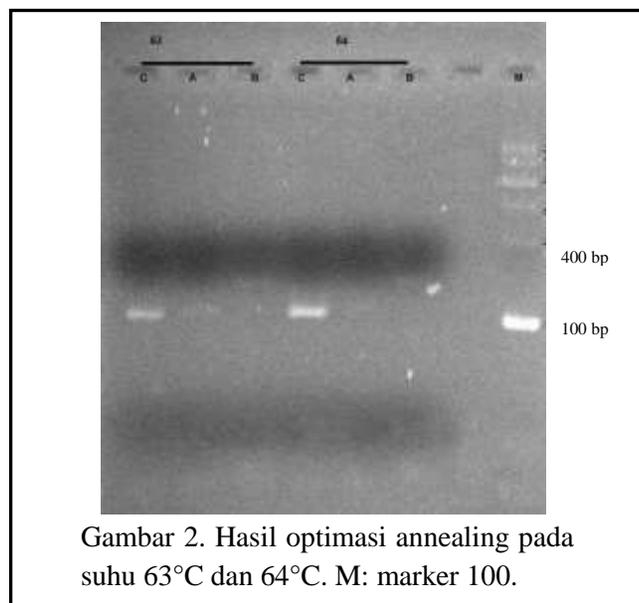
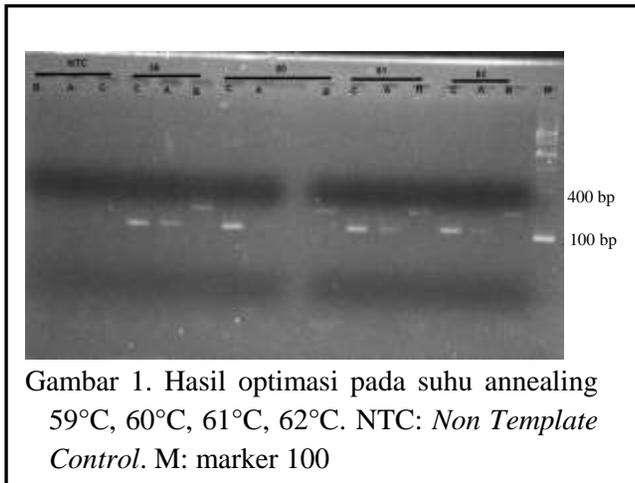
Tiga macam *master mix* dibuat berdasarkan jenis primer (0,25 μM), yaitu *master mix* untuk reaksi pertama berisi primer generik dan *primer C antisense*. *Master mix* untuk reaksi kedua berisi primer generik dan *primer C antisense*. *Master mix* untuk reaksi ketiga berisi primer beta aktin. Sebanyak 2 μL DNA ditambahkan ke dalam 4,2 μL larutan *master mix*. Sebanyak 13,8 μL *nuclease free water* ditambahkan ke dalam larutan. Dua puluh μL larutan diamplifikasi dengan *thermal cyclers*. Kondisi temperatur siklus PCR adalah : 5 menit pada suhu 95°C untuk program *hotstart*, denaturasi dilakukan selama 5 menit pada 96°C . Setelah itu diikuti oleh 35 siklus selama 1 menit pada 95°C , 1 menit pada suhu annealing, 1 menit pada 72°C . Elongasi dilakukan selama 7 menit pada 72°C . Suhu annealing yang digunakan optimasi adalah

59°C , 60°C , 61°C , 62°C , 63°C , 64°C . Produk yang telah diamplifikasi diamati pada 2% gel agarosa dengan 0,3 μL (0,5 mg/mL) *gel red*. Genotip diidentifikasi dengan ada tidaknya target *sequence* yang diamplifikasi.

HASIL

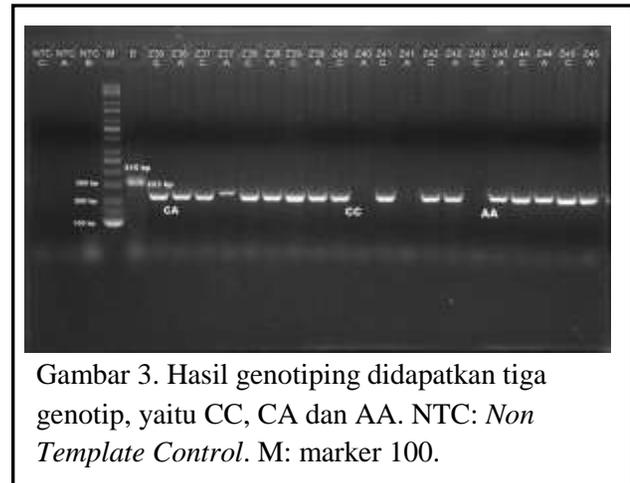
Optimasi suhu annealing pada tehnik ARMS-PCR dilakukan pada suhu-suhu sebagai berikut: 59°C , 60°C , 61°C , 62°C , 63°C dan 64°C . Hasil PCR kemudian dianalisis menggunakan agarose gel 2% dengan 0,3 μL (0,5 mg/mL) *gel red*. Hasil optimasi dianalisa berdasarkan ketebalan segmen DNA tiap reaksi dan beta aktin yang dihasilkan dari tiap suhu. Berdasarkan hasil elektroforesis maka didapatkan bahwa suhu annealing 60°C merupakan suhu yang paling

optimal dinilai berdasarkan ketebalan segmen DNA dan kemunculan beta aktin (Gambar 1 dan Gambar 2).



Hasil optimasi ini diaplikasikan pada seluruh sampel. Pada suhu annealing optimal didapatkan tiga genotip pada individu kasus dan kontrol. Tiga genotip tersebut adalah CC, CA dan AA (Gambar 3). Pada subjek kontrol ditemukan tiga genotip, yaitu CC, CA dan AA, sedangkan pada subjek kasus hanya ditemukan dua genotip, yaitu CC dan CA. Panjang fragmen untuk tiap genotip adalah

223 bp. Beta aktin merupakan kontrol internal yang mempunyai panjang fragmen 315 bp.



Hasil analisa *Chi-square* (Tabel 2) menunjukkan bahwa perbedaan frekuensi genotip dan alel polimorfisme -2578*C/A gena VEGF-A pada subjek kasus dan kontrol secara statistik tidak bermakna ($p=0,614$ untuk frekuensi genotip dan $p=1,000$ untuk frekuensi alel).

PEMBAHASAN

Amplification Refractory Mutation System (ARMS) merupakan metode yang dikembangkan berdasarkan PCR.¹³ Teknik ini menggunakan primer PCR yang spesifik terhadap *sequence*. Amplifikasi DNA pada sampel hanya akan terjadi jika alel target terdapat didalam DNA sampel.² Primer yang digunakan ada tiga macam, yaitu: primer normal, primer mutan dan generik primer.¹

Produk PCR yang terbentuk dianalisa menggunakan elektroforesis gel. Produk terbentuk pada reaksi satu menandakan bahwa alel DNA pasien adalah homozigot normal. Produk yang terbentuk pada kedua reaksi menandakan alel pasien heterozigot.

Tabel 2. Distribusi frekuensi genotip dan alel pada kelompok kasus dan kontrol

Variabel		Kasus (n=20)	Kontrol (n=25)	OR (CI 95%)	p
Genotip:	AA	0	1 (0,04)	-	0,614*
	CA	16 (0,80)	18 (0,72)		
	CC	4 (0,20)	6 (0,24)		
Alel:	A	16 (0,40)	20 (0,40)	1,000	1,000*
	C	24 (0,60)	30 (0,60)	(0,428-2,337)	

*Chi-square

Produk yang terbentuk pada reaksi dua menandakan alel pasien homozigot untuk mutasi. Kemampuan ARMS-PCR dalam mendeteksi *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) pada pasien heterozigot merupakan suatu keuntungan tersendiri sehingga metode ini banyak digunakan.¹

Metode ARMS-PCR ini dapat digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi dan polimorfisme pada DNA sampel. Pada penelitian polimorfisme ini dapat diketahui tingkat risiko individu dapat mengalami ulkus diabetika. Hal ini berdasarkan pada nilai *odd ratio* A terhadap C yang didapatkan adalah 1,000 (p=1,000, CI=95% (0,428-2,337)), artinya bahwa pembawa alel A mempunyai probabilitas untuk menderita ulkus diabetika sebesar 50%. Amoli *et al.* (2011) melaporkan bahwa frekuensi alel A yang rendah akan menyebabkan tidak cukupnya angiogenesis pada pasien DM tipe 2 dengan ulkus diabetika. Kurangnya angiogenesis ini akan menyebabkan terganggunya penyembuhan luka. Penelitian pada polimorfisme ini dapat digunakan sebagai upaya pencegahan sehingga DM tidak berkembang menjadi ulkus diabetika. Upaya pencegahan dapat ditingkatkan dengan menggunakan metode analisa yang cepat, mudah dan dapat dipercaya.

Metode ARMS-PCR merupakan metode yang dapat dipercaya dan tidak membutuhkan waktu lama untuk mengetahui adanya mutasi atau delesi. Metode ini mempermudah peneliti untuk mengetahui dengan cepat probabilitas individu dengan DM tipe 2 untuk berkembang menjadi ulkus diabetika. ARMS-PCR ini dikembangkan untuk melakukan amplifikasi alel tanpa menggunakan enzim restriksi dan radioisotop. Hal ini memungkinkan untuk melakukan identifikasi dengan satu kali reaksi PCR sehingga akan lebih murah karena tidak memerlukan manipulasi lain setelah PCR.¹⁴

SIMPULAN

Teknik ARMS-PCR merupakan teknik yang sederhana dan mudah untuk mengetahui adanya polimorfisme VEGF-A - 2578*C/A pada individu diabetes melitus dengan dan tanpa ulkus diabetika.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami menyampaikan ucapan terimakasih kepada Prof. Dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc., PhD dan Prof. Dr. Mustofa, M.Kes, Apt yang telah membimbing dan memberi banyak dukungan dalam proses penelitian sampai seles dan Biro Kerjasama Luar Negeri yang telah membantu dalam pendanaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wellesley, B. What is Amplification Refractory Mutation System?. In: Irohner (Ed). Available from: <http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/94806.aspx>.2011.
2. Newton, CR, Graham, A., Heptinstall, LE., Powell, SJ, Summers, C, Kalsheker, N *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Res.* 1989;17(7):2503-2516.
3. Wild, S, Roglig, G, Green, A, Sicree, R, King, H. Global burden of diabetes mellitus in the year 2000. *Diabet Care.* 2001;27(5):1-28.
4. Cavanagh, P, Lipsky B, Bradbory A. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet.* 2005;366(9498):1725-1735.
5. Hena, J. Studies on bacterial infections of diabetic foot ulcer. *Afr J Cln Expert Microbiol.* 2010;11(3):146-149.
6. Shakil, S, Khan, AU. Infected foot ulcers in male and female diabetic patients: a clinico-bioinformative study. *Microbiol Antimicrob.* 2010;9: 2.
7. Bao, P, Kodra, A, Tomic-canic, M, Golinko, MS, Ehrlich, HP, Brem, H. The role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res.* 2010;153(2):347-358.
8. Tellechea, A, Leal, E, Veves, A, Carvalho, E. Inflammatory and Angiogenic Abnormalities in Diabetic Wound Healing: Role of Neuropeptides and Therapeutic Perspectives. *Circ Vasc J.* 2010;3:43-55.
9. Beck, LJ, D'Amore, PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* 1997;11:365-373.
10. Wilgus TA, DiPietro LA. Complex roles for VEGF in dermal wound healing. *J Invest dermatolog.* 2012; 132(2):493-494. B
11. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphism in the promoter and 5' UTR regions of human vascular endothelial growth factor gene. 1999. In: Shahbazi, M, Fryer, A.A., Pravica, V., Brogan, I.J., Ramsay, H.M., Hutchinson, I.V. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms Are Associated with Acute Renal Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:260-264.
12. Amoli MM, Hasani-Ranjbar S, Roohipour N, Sayahpour FA, Amiri P, Zahedi, P et al. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabet Res Cln Practice* 2011; 93(2): 215-219.
13. Najmabadi, H, Teimourian, S, Khatibi, T, Neishabury, M, Pourfarzad, F, Jalil-Nejad, S, Azad, M et al. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and Reverse Hybridization in the Detection of Beta-thalassemia Mutation. *Arch Irn Med.* 2001;4(4):165-170.
14. Collins, A, Xiayi, K. Primer1: Primer Design Web Service for Tetra-Primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatic J.* 2012; 6:55-58.

PENGARUH EKSPRESI LIPOPROTEIN LIPASE TERHADAP KADAR TRIGLISERIDA SERUM PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 YANG TERPAPAR KUERSETIN JANGKA PENDEK

Sylvia Rianissa Putri¹, Arta Farmawati², Tasmini²

¹Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Bengkulu

²Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

E-mail: sylvia.r.putri@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang. Enzim lipoprotein lipase (LPL) dikenal sebagai enzim yang menghidrolisis trigliserida di jaringan ekstrahepatik. Pada diabetes melitus dapat terjadi gangguan regulasi LPL akibat defisiensi kerja insulin sehingga dapat mengakibatkan abnormalitas metabolisme makronutrien yang pada panjang dapat menyebabkan dislipidemia diabetikum. Kuersetin dikenal dapat memperbaiki profil lipid pada berbagai hewan coba dengan kondisi diabetes melitus (DM) maupun kondisi lainnya. Selain itu, paparan kuersetin jangka panjang diketahui dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan ekstrahepatik.

Metode. Penelitian ini menggunakan desain kuasi-eksperimental *post test only control group* dengan subyek tikus Wistar yang dibagi dalam 9 kelompok dengan dosis perlakuan berbeda. Setelah 4 minggu perlakuan, kadar trigliserida serum diperiksa. Tikus dieutanasia dan *m. soleus* diambil untuk diperiksa ekspresi LPL dengan metode ELISA.

Hasil Penelitian. Kadar trigliserida serum tertinggi ditemukan pada kelompok kuersetin 5 mg/kgBB dan terendah pada kelompok kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid. Kadar LPL pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo lebih rendah dari tikus normal. Di antara kelompok DM, kadar LPL tertinggi ditemukan pada kelompok glibenklamid 5 mg/kgBB, sedangkan kadar terendah ditemukan pada kelompok kuersetin 5 mg/kgBB. Tidak terdapat perbedaan kadar trigliserida serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka yang signifikan antar kelompok perlakuan. Korelasi antara kadar trigliserida serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka setelah 4 minggu perlakuan lemah dan tidak bermakna.

Simpulan. Pemberian kuersetin tidak mempengaruhi kadar trigliserida serum, namun dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan otot rangka walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna. Kadar trigliserida serum tidak berkorelasi dengan ekspresi LPL di jaringan otot rangka setelah 4 minggu perlakuan.

Kata kunci: kuersetin, trigliserida, ekspresi LPL, otot rangka, DM tipe 2.

PENDAHULUAN

Lipoprotein lipase (LPL) merupakan enzim penting dalam metabolisme dan transpor lipid.¹ Enzim ini merupakan golongan enzim hidrolase dengan substrat

trigliserida yang berasal dari kilomikron dan *very low density lipoprotein* (VLDL), akibatnya kandungan trigliserida di kilomikron dan VLDL akan menurun.²

Pada diabetes melitus (DM) dapat terjadi gangguan regulasi lipoprotein lipase. Penelitian Tavangar *et al.* tentang regulasi LPL pada tikus DM menunjukkan bahwa keadaan DM menimbulkan penurunan aktivitas LPL di jaringan adiposa epididimis dan otot jantung.³ Gangguan regulasi LPL ini dapat menyebabkan abnormalitas metabolisme sehingga menimbulkan dislipidemia diabetikum.^{4,5} Salah satu ciri dislipidemia diabetikum adalah peningkatan kadar trigliserida darah. Peningkatan kadar trigliserida darah juga bersifat aterogenik, peningkatan kadar trigliserida puasa sangat berhubungan dengan risiko infark miokardium.⁴

Dislipidemia diabetikum pada DM tipe 2 biasanya tidak terkoreksi dengan sempurna walaupun dengan kontrol glikemik yang baik.⁵ Fondjo *et al.* menyatakan bahwa pemberian glibenklamid 5 mg/kg berat badan selama 6 minggu pada tikus DM dapat menurunkan kadar trigliserida secara signifikan,⁶ namun penelitian Mughal *et al.* menunjukkan hasil yang berbeda.⁷

Saat ini eksplorasi senyawa alam dalam penatalaksanaan DM dan komplikasinya telah banyak dilakukan, salah satunya adalah kuersetin. Berbagai penelitian menunjukkan kuersetin dapat menurunkan kadar trigliserida dan kolesterol total darah hewan coba, serta memperbaiki steatohepatitis non alkoholik yang diinduksi diet tinggi lemak pada tikus gurun.^{8,9,10} Pemberian kuersetin selama 41 minggu juga dapat menyebabkan peningkatan ekspresi gen LPL di jaringan paru dengan menggunakan pemeriksaan *microarray*.¹¹

Berdasarkan data mengenai efek kuersetin terhadap kadar trigliserida serum dan LPL, maka dirancang penelitian untuk mengetahui ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus model DM tipe 2 dan hubungannya dengan kadar trigliserida serum pada paparan kuersetin jangka pendek.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain kuasi-eksperimental *post test only control group*. Subyek penelitian adalah tikus Wistar jantan masing-masing berusia 3 bulan dengan berat 200-300 g. Sampel penelitian adalah jaringan otot rangka dan darah hewan coba. Besar sampel dihitung dengan rumus Federer: $(n - 1)(k - 1) \geq 15$ dengan n adalah jumlah sampel dan k adalah jumlah kelompok. Karena pada penelitian ini subyek dibagi dalam 9 kelompok, maka didapat jumlah minimal sampel untuk masing-masing kelompok sejumlah 3.

Dua puluh tujuh ekor tikus Wistar jantan diadaptasi selama 3 hari dengan pakan standar AIN-93M sesuai komposisi Reeves *et al.*¹² Tikus dipelihara dalam kandang terpisah yang memungkinkan akses pakan AIN-93M dan air *ad libitum*, dalam suhu ruang dan dengan siklus terang-gelap 12 jam.

Setelah masa adaptasi, 24 ekor tikus dipilih secara acak untuk diinduksi diabetes melitus (DM) dengan injeksi intraperitoneal 60 mg/kgBB *streptozotocin* (STZ) dan 120 mg/kgBB nikotinamida,¹³ sedangkan tiga ekor sisanya dimasukkan dalam kelompok tikus normal yang mendapat plasebo (K1). Sebelum induksi, tikus dipuasakan semalam.¹⁴ *Streptozotocin* dilarutkan dalam larutan dapar sitrat (pH 4,5) dan diberikan dengan dosis 60 mg/kgBB diikuti dengan pemberian nikotinamida yang telah dilarutkan dalam larutan garam fisiologis dengan dosis 120 mg/kgBB setelah lima belas menit pemberian STZ. Setelah 7-14 hari injeksi STZ-nikotinamida, kadar glukosa darah puasa diperiksa untuk memastikan DM. Tikus dinyatakan DM bila kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL.¹³

Tikus yang telah dinyatakan DM dibagi ke dalam 8 kelompok, yaitu kelompok DM yang mendapat plasebo (K2), kelompok DM

yang diberi kuersetin 5 mg/kg berat badan (BB) (K3), kuersetin 20 mg/kgBB (K4), kuersetin 80 mg/kgBB (K5), kombinasi kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB (K6), kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB (K7), kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB (K8), dan glibenklamid 5 mg/kgBB (K9). Kuersetin bubuk (Sigma) dilarutkan dengan *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,5%.¹⁵ Larutan kuersetin diberikan per sondase sesuai dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan. Glibenklamid dilarutkan dengan CMC 0,5%. Larutan glibenklamid diberikan per sondase, seperti juga pada pemberian kuersetin.

Setelah perlakuan selama 4 minggu, kadar glukosa darah puasa dan kadar trigliserida serum seluruh kelompok diperiksa. Darah tikus diambil dari sinus retroorbitalis dan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa dan trigliserida darah. Tikus dipuaskan semalam sebelum pengambilan darah. Kadar GDP dan trigliserida diperiksa dengan metode kolorimetri, yaitu GOD-PAP untuk pemeriksaan kadar glukosa dan GPO-PAP untuk pemeriksaan kadar trigliserida. Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera di manual reagen (GOD FS dan Triglycerides FS, Diasys).

Setelah pengambilan darah, seluruh tikus dieutanasia dengan teknik dislokasi servikal dan dilakukan persiapan pengambilan jaringan. Jaringan otot rangka *m. soleus* diambil kemudian dihomogenasi sesuai dengan prosedur pada penelitian sebelumnya.¹⁶ Homogenat kemudian digunakan untuk pemeriksaan ekspresi LPL dengan metode ELISA. Prosedur ELISA dilakukan sesuai petunjuk dari produsen (Uscn, Inc.).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Glukosa Darah Puasa

Dua kelompok mengalami peningkatan kadar glukosa darah puasa (GDP), yaitu kelompok tikus DM yang mendapat plasebo dan kelompok kuersetin 20 mg/kgBB, sedangkan 7 kelompok lainnya mengalami penurunan kadar GDP, namun perubahan kadar GDP ini tidak signifikan (Tabel 1).

Penurunan kadar GDP pada K1 tampaknya merupakan variasi normal kadar GDP. Penurunan kadar GDP pada kelompok DM sesuai dengan hasil penelitian Jeong *et al.* Efek penurunan kadar glukosa darah oleh kuersetin dapat disebabkan oleh penghambatan α -glukosidase sehingga menurunkan absorpsi karbohidrat. Kuersetin juga dapat meningkatkan kadar adiponektin plasma sehingga memperbaiki resistansi insulin dan meningkatkan ambilan glukosa oleh jaringan-jaringan yang sensitif insulin sehingga menurunkan kadar glukosa darah.¹⁰

Seluruh kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid menunjukkan penurunan GDP dalam 4 minggu, berbeda dengan kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Hal ini mengindikasikan kombinasi kuersetin dan glibenklamid lebih berpotensi dalam mengontrol kadar GDP pada DM, yang dapat disebabkan oleh peran glibenklamid dalam meningkatkan sekresi insulin sehingga menurunkan kadar glukosa darah.

Peningkatan kadar GDP yang ditemukan pada tikus DM yang mendapat plasebo mungkin disebabkan oleh memburuknya kondisi DM. Diabetes melitus menyebabkan peningkatan katabolisme sehingga memungkinkan kadar glukosa darah tetap tinggi.^{17,18,19} Kelompok kuersetin 20 mg/kgBB juga mengalami peningkatan GDP. Peningkatan ini dapat diakibatkan oleh durasi perlakuan yang relatif singkat dan rendahnya dosis kuersetin yang diberikan pada hewan coba.

Tabel 1. Kadar glukosa darah puasa sebelum dan setelah perlakuan.

Kelompok	n	GDP I (mg/dL)	GDP II (mg/dL)	p*
Tikus normal + plasebo	3	82,32 ± 15,31 ^a	65,71 ± 22,05	0,310
Tikus DM + plasebo	3	171,37 ± 13,61 ^{bc}	346,68 ± 137,75	0,153
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	153,90 ± 39,11 ^{be}	111,21 ± 35,53	0,422
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	140,96 ± 11,52 ^{bdg}	205,42 ± 107,59	0,382
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	273,54 ± 177,17 ^b	142,52 ± 81,65	0,396
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	283,79 ± 94,48 ^{bh}	164,11 ± 58,09	0,307
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	290,38 ± 75,74 ^{bdh}	238,58 ± 162,18	0,733
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	337,21 ± 151,38 ^{bh}	189,09 ± 31,09	0,290
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	182,77 ± 47,38 ^b	110,09 ± 49,05	0,304
<i>p</i>		0,039**	0,065***	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p \geq 0,05$. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

GDP I adalah kadar glukosa darah puasa 1 hari sebelum perlakuan dan GDP II adalah kadar glukosa darah puasa setelah 4 minggu perlakuan. DM adalah diabetes melitus.

*Uji T berpasangan: $p \geq 0,05$.

**Uji Kruskal-Wallis GDP I: $p < 0,05$. Uji *post hoc* Mann-Whitney U: $p \geq 0,05$; notasi berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai $p = 0,05$, notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan nilai $p > 0,05$.

***Uji Kruskal-Wallis GDP II: $p \geq 0,05$.

Kadar Trigliserida Serum

Kadar trigliserida serum seluruh kelompok berada dalam rentang normal. Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok (Tabel 2). Tampaknya dosis kuersetin yang digunakan dalam penelitian ini (5 mg/kgBB, 20 mg/kgBB, dan 80 mg/kgBB dengan atau tanpa kombinasi dengan glibenklamid 5 mg/kgBB) tidak menunjukkan perbedaan bermakna dalam rentang waktu 4 minggu.

Berbagai penelitian menunjukkan induksi DM dengan STZ dapat meningkatkan kadar

trigliserida serum pada tikus Wistar dewasa dalam waktu 5 minggu setelah injeksi STZ,^{20,21} namun hasil yang sama tidak ditemukan pada penelitian ini. Hal ini mungkin disebabkan oleh dosis STZ-nikotinamida yang digunakan tidak mencukupi untuk menyebabkan abnormalitas kadar trigliserida serum dalam waktu 5 minggu sehingga belum dapat menimbulkan dislipidemia diabetikum, ditambah lagi dengan kemungkinan adanya variasi genetik antar individu dalam memetabolisme makronutrien, khususnya lipid.

Tabel 2. Kadar trigliserida serum setelah 4 minggu perlakuan.

Kelompok	n	Kadar Trigliserida Serum (mg/dL)	p
Tikus normal + plasebo	3	100,42 ± 14,87	0,933*
Tikus DM + plasebo	3	93,16 ± 24,84	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	106,62 ± 33,38	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	104,99 ± 21,37	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	101,55 ± 24,16	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	98,96 ± 5,53	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	97,39 ± 28,52	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	79,44 ± 15,78	
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	101,08 ± 30,05	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p \geq 0,05$. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

DM: diabetes melitus.

*Uji *one-way* ANOVA: $p \geq 0,05$.

Kadar trigliserida serum kelompok glibenklamid 5 mg/kgBB berada dalam batas normal, walaupun sedikit lebih tinggi dari kelompok tikus normal dan tikus DM yang mendapat plasebo. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Movahedian *et al.*²⁰ Walaupun penelitian Mughal *et al.* tidak menemukan penurunan trigliserida serum yang bermakna setelah pemberian glibenklamid selama 12 minggu,⁷ namun penelitian Natrass *et al.* menunjukkan pemberian glibenklamid 5 mg dapat menurunkan kadar trigliserida serum secara signifikan serta meningkatkan kadar gliserol dan asam lemak bebas plasma. Efek perubahan kadar trigliserida, gliserol, dan asam lemak bebas darah ini tampaknya dipengaruhi oleh kadar insulin di sirkulasi dan bukan disebabkan efek ekstrapankreas glibenklamid. Glibenklamid bekerja dengan meningkatkan sekresi insulin, sehingga pemberian glibenklamid dapat meningkatkan lipogenesis di jaringan adiposa dan menormalkan kadar trigliserida dalam darah.²²

Kadar trigliserida pada kelompok kuersetin 5 mg/kgBB, kuersetin 20 mg/kgBB, dan kuersetin 80 mg/kgBB masih berada dalam rentang normal namun sedikit lebih tinggi dibanding kelompok tikus normal, tikus DM yang mendapat plasebo, dan kelompok glibenklamid 5 mg/kgBB. Kadar trigliserida serum ketiga kelompok yang lebih tinggi dari kelompok kontrol mungkin disebabkan oleh durasi pemberian kuersetin yang singkat sehingga belum dapat menimbulkan efek penurunan kadar trigliserida serum. Kemungkinan lainnya adalah dosis kuersetin yang digunakan belum cukup untuk menurunkan kadar trigliserida serum. Faktor lain yang mungkin berperan adalah adanya *stressor* pada hewan coba selama masa perawatan, yaitu karena sondase yang dilakukan setiap hari dan ruang gerak yang terbatas di dalam kandang hewan. Peningkatan kortisol pada keadaan stres dapat

meningkatkan sekresi VLDL,²³ sehingga meningkatkan kadar trigliserida dalam darah. Hal inilah yang mungkin menyebabkan perubahan kadar trigliserida pada kelompok-kelompok ini tidak signifikan.

Kadar trigliserida serum kelompok kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid berada dalam rentang normal namun lebih rendah dibanding kelompok kontrol, walaupun tidak bermakna secara statistik. Tampaknya dosis kombinasi ini lebih baik dibanding dosis lain dalam menurunkan kadar trigliserida serum, kemungkinan disebabkan oleh efek kuersetin dalam menurunkan kadar trigliserida di sirkulasi atau proses sintesis endogennya dan mencegah kelebihan trigliserida dan komponennya dideposit di jaringan non-adiposa.^{8,10} Penurunan sintesis trigliserida oleh kuersetin tampaknya dipengaruhi oleh penurunan ekspresi *peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR- α) dan *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c).²⁴ *Sterol regulatory element-binding protein-1c* merupakan regulator enzim lipogenik, perubahan ekspresinya akan mempengaruhi sekresi VLDL.²⁵

Kadar trigliserida tikus-tikus kelompok kuersetin 5 mg/kgBB, kuersetin 20 mg/kgBB, dan kuersetin 80 mg/kgBB menunjukkan pola yang berbanding terbalik dengan peningkatan dosis. Pola yang sama juga ditemukan pada ketiga kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid, namun ketiga kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid memiliki kadar trigliserida serum yang lebih rendah dibanding kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Pola ini tidak sesuai dengan penelitian Rivera *et al.* yang menyatakan efek penurunan kadar trigliserida oleh kuersetin tidak dipengaruhi oleh dosis.²⁶ Kadar trigliserida serum kelompok-kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid yang relatif lebih rendah dibanding kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin ini dapat

disebabkan oleh efek glibenklamid dalam meningkatkan sekresi insulin. Peningkatan sekresi insulin akan memacu ambilan trigliserida oleh jaringan dan memicu lipogenesis sehingga menurunkan kadar trigliserida serum. Efek glibenklamid dan efek kuersetin dalam menurunkan kadar trigliserida di sirkulasi atau proses sintesis endogennya dan mencegah kelebihan trigliserida dan komponennya dideposit di jaringan non-adiposa dapat bersinergi dalam meregulasi kadar trigliserida serum.

Kadar Lipoprotein Lipase Jaringan Otot Rangka

Analisis kadar LPL *m. soleus* dengan uji Kruskal-Wallis menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Data dan analisisnya disajikan pada Tabel 3. Walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, namun kadar LPL pada tikus kontrol DM lebih rendah dari tikus normal. Seperti yang telah diketahui, insulin meningkatkan transkripsi LPL di jaringan.²⁷ Penurunan kadar insulin dalam darah akibat kerusakan pada sel β pankreas yang

disebabkan oleh STZ akan menurunkan transkripsi LPL. Hal inilah yang tampaknya menyebabkan penurunan ekspresi LPL pada tikus DM. Karena penelitian ini tidak memeriksa kadar insulin darah, maka adanya penurunan kadar insulin darah tidak dapat dipastikan.

Seluruh kelompok memiliki kadar LPL yang lebih tinggi dari kelompok tikus normal dan tikus DM yang mendapat plasebo. Dua kelompok memiliki kadar LPL yang lebih tinggi dari tikus DM yang mendapat plasebo dan mendekati nilai normal, yaitu kelompok kuersetin 5 mg/kgBB dan kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid. Kuersetin tampaknya dapat meregulasi LPL dengan meningkatkan transkripsinya sehingga meningkatkan ekspresi LPL di jaringan otot rangka.¹¹ Kadar LPL kelompok kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid lebih tinggi dari kelompok kuersetin 5 mg/kgBB. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh kemampuan kuersetin dan insulin dalam meningkatkan transkripsi LPL. Seperti yang telah diketahui, glibenklamid bekerja dengan meningkatkan sekresi insulin.²⁸

Tabel 3. Kadar LPL *m. soleus* setelah 4 minggu perlakuan.

Kelompok	n	Kadar LPL		P
		(ng/mL)	(ng/g)	
Tikus normal + plasebo	3	74,10 ± 45,67	3.704,83	0,099*
Tikus DM + plasebo	3	67,22 ± 42,81	3.360,84	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	80,09 ± 41,55	4.004,38	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	129,44 ± 27,63	6.472,01	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	111,86 ± 16,02	5.593,16	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	93,38 ± 1,88	4.669,18	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	144,48 ± 51,91	7.223,82	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	139,49 ± 25,87	6.974,35	
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	150,31 ± 61,41	7.515,60	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

LPL adalah lipoprotein lipase, diperiksa dari homogenat 100 mg jaringan *m. soleus*.

*Uji *one-way* ANOVA: $p \geq 0,05$.

Lima kelompok lainnya memiliki kadar LPL yang jauh lebih tinggi dari tikus DM yang mendapat plasebo dan tikus normal. Tingginya kadar LPL inilah yang tampaknya

menyebabkan kadar trigliserida serum tetap berada dalam batas normal. Penelitian terdahulu menunjukkan ekspresi LPL yang berlebihan dapat menurunkan kadar

trigliserida, kolesterol, dan *low density lipoprotein* (LDL).²⁹ Di sisi lain, ekspresi LPL yang berlebihan ini dapat berdampak negatif pada metabolisme, karena walaupun ekspresi LPL yang berlebihan dapat menurunkan kadar trigliserida, kolesterol, dan LDL sehingga memperbaiki aterosklerosis,^{29,30} namun ekspresi LPL di jaringan otot yang berlebihan juga dapat menyebabkan resistansi insulin melalui peningkatan sintesis trigliserida.^{31,32} Hal inilah yang tampaknya menyebabkan peningkatan kadar GDP pada kelompok 20 mg/kgBB.

Kadar LPL antara kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin dan kelompok-kelompok yang mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid 5 mg/kgBB menunjukkan pola yang sama. Kadar LPL tertinggi ditemukan pada kelompok 20 mg/kgBB, diikuti oleh kelompok kuersetin 80 mg/kgBB dan kuersetin 5 mg/kgBB. Pola yang sama juga terlihat pada kelompok-kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid. Kadar LPL kelompok-kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid relatif lebih tinggi dibanding kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Hal ini dapat disebabkan oleh efek glibenklamid dalam meningkatkan sekresi insulin. Peningkatan sekresi insulin akan meningkatkan transkripsi LPL. Efek glibenklamid dan efek kuersetin dalam meregulasi transkripsi LPL dapat bersinergi dalam meregulasi kadar LPL di jaringan otot rangka.

Kuersetin tampaknya dapat meregulasi LPL dengan meningkatkan transkripsinya. Pemberian kuersetin dengan dosis 1% (setara dengan 500 mg/kgBB) selama 41 minggu dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan paru berdasarkan hasil *microarray*.¹¹ Berbeda dengan hasil penelitian de Boer *et al.*, pada penelitian ini tidak ditemukan adanya perbedaan ekspresi LPL yang signifikan antar kelompok hewan coba, kemungkinan

disebabkan oleh durasi perlakuan yang lebih singkat.

Hubungan antara kadar LPL *m. soleus* dan kadar trigliserida serum dilihat dengan menggunakan uji korelasi Pearson. Berdasarkan uji Pearson diketahui bahwa kadar trigliserida serum berbanding terbalik dengan kadar LPL, namun korelasinya sangat lemah dan tidak bermakna (Tabel 4).

Tabel 4. Uji korelasi kadar trigliserida serum dan kadar LPL.

		Kadar LPL <i>m. soleus</i>
Kadar trigliserida serum	Koefisien korelasi	-0,092
	<i>P</i>	0,648
	<i>N</i>	27

Tampaknya peningkatan ekspresi LPL menyebabkan kadar trigliserida dapat berada pada rentang normal. Secara teoretis, peningkatan ekspresi LPL akan meningkatkan hidrolisis trigliserida pada kilomikron dan VLDL di dalam darah sehingga menurunkan kadar trigliserida di sirkulasi, kemudian gliserol dan asam lemak hasil hidrolisis trigliserida yang dikatalisis oleh LPL dapat digunakan sebagai sumber energi bagi jaringan otot rangka.³² Pada DM tipe 2 cenderung terjadi produksi VLDL yang berlebihan, kemungkinan disebabkan adanya interaksi antara hiperglikemia dan defek genetik. Selain itu, pada DM tipe 2 juga terjadi gangguan bersihan VLDL. Penurunan laju katabolisme VLDL ini berbanding lurus dengan penurunan kadar glukosa darah.³³

SIMPULAN

Perlakuan kuersetin dengan variasi dosis selama 4 minggu tidak mempengaruhi kadar trigliserida serum secara signifikan, namun dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan

otot rangka walaupun tidak secara signifikan. Kadar trigliserida serum tidak berkorelasi dengan ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 setelah pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, dan glibenklamid 5 mg/kgBB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297:E271-E288.
2. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's illustrated biochemistry. 28th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2009.
3. Tavangar K, Murata Y, Pedersen ME, Goers JF, Hoffman AR, Kraemer FB. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1672-1678.
4. Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circ.* 1997; 96: 2520-2525.
5. Goldberg IJ. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *The J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (3): 965-971.
6. Fondjo FA, Kamgang R, Oyono JLE, Yonkeu JN. Anti-dyslipidemic and antioxidant potentials of methanol extract of *Kalanchoe crenata* whole plant in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Trop J Pharm Res.* 2012; 11 (5): 767-775.
7. Mughal MA, Aamir K, Ali M, Maheri WM, Jan M. The effects of glibenclamide on serum lipids and lipoprotein in type II non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Pak Med Assoc.* 1999; 49 (4): 89-92.
8. Ying HZ, Liu YH, Yu B, Wang ZY, Zang JN, Yu CH. Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils. *Food Chem Toxicol.* 2013; 52: 53-60.
9. Juźwiak S, Wójcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Bialecka M, Wenda-Różewicka L, Gawrońska-Szklarz B, Drożdżik M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep.* 2005; 57: 604-609.
10. Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nut Res Pract.* 2012; 6 (3): 201-207.
11. de Boer VCJ, van Schothorst EM, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Rietjens IMCM, Hollman PCH, Keijer J. Chronic quercetin exposure affects fatty acid catabolism in rat lung. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 2847-2858.
12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-1951.
13. Barik R, Jain S, Qwatra D, Joshi A, Tripathi GS, Goyal R. Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Ichnocarpus frutescens* in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes in rats. *Indian J Pharmacol.* 2008; 40: 19-22.
14. Conn PM. Sourcebook of models for biomedical research. New Jersey: Humana Press, 2008.
15. Nanjundan PK, Arunachalam A, Thakur RS. Antinociceptive property of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek seeds) in high fat diet-fed/low dose streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Pharmacologyonline.* 2009; 2: 24-36.
16. Tan MH, Sata T, Havel RJ. The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. *J Lipid Res.* 1977; 18: 363-370.
17. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Allah Verdi A, Mofidian SMA, Lame Rad B. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22 (2): 60-64.
18. Maciel RM, Costa MM, Martins DB, França RT, Schmatz R, Graça DL, Duarte MMMF,

- Danesi CC, Mazzanti CM, Schetinger MRC, Paim FC, Palma HE, Abdala FH, Stefanello N, Zimpel CK, Felin DV, Lopes STA. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res Vet Sci*. Accessed at 7 Aug 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.028>.
19. Sheela N, Jose MA, Sathyamurthy D, Kumar BN. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic nephropathy in rats. *IJKD*. 2013; 7: 117-123.
 20. Movahedian A, Zolfaghari B, Sajjadi SE, Moknatjou R. Antihyperlipidemic effect of *Peucedanum pastinacifolium* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics*. 2010; 65 (6): 629-633.
 21. Krishna B D, Rao S, Satyanarayana ML. Serum insulin levels and lipid profiles of streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *J Ind Vet Assoc*. 2012; 10: 22-26.
 22. Natrass M, Hinks L, Smythe P, Todd PG, Alberti KG.. Comparative effects of two doses of glibenclamide upon metabolic rhythms in maturity-onset diabetics. *Diabetes Metab*. 1978; 4 (3): 175-180.
 23. Elam MB, Wilcox HG, Solomon SS, Heimberg M. In vivo growth hormone treatment stimulates secretion of very low density lipoprotein by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology*. 1992; 131 (6): 2717-2722.
 24. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55: 530-540.
 25. Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Deng X, Raghov R, Kumar P, Heimberg M, Russell JC. Increased hepatic VLDL secretion, lipogenesis, and SREBP-1 expression in the corpulent JCR:LA-cp rat. *J Lipid Res*. 2001; 42: 2039-2048.
 26. Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*. 2008; 16: 2081-2087.
 27. Unal R, Pokrovskaya I, Tripathi P, Monia BP, Kern PA, Ranganathan G. Translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes: depletion of cellular protein kinase C α activates binding of the C subunit of protein kinase A to the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *Biochem J*. 2008; 413 (2): 315-322.
 28. Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology*. 9th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2004.
 29. Pulawa LK, Jensen DR, Coates A, Eckel RH. Reduction of plasma triglycerides in apolipoprotein C-II transgenic mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle. *J Lipid Res*. 2007; 48: 145-151.
 30. Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, Kitamine T, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Shionoiri F, Yahagi N, Gotoda T, Yazaki Y, Yamada N. Overexpressed lipoprotein lipase in atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res*. 1999; 40: 1677-1685.
 31. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 7522-7527.
 32. Weinstock PH, Levak-Frank S, Hudgins LC, Radner H, Friedman JM, Zechner R, Breslow JL. Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 10261-10266.
 33. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*. 1987; 2

EFEK EKSTRAK KULIT MANGGIS PADA MDA DARAH TIKUS WISTAR TERPAPAR FLUPHENAZIN DEKANOAT

Innawati Jusup¹, Irena Aryani Puspwardojo¹

¹Bagian Biokimia, ²Asisten Mahasiswa Biokimia
Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

E-mail: innawatijusup@yahoo.com

ABSTRAK

Latar belakang: Flufenazin dekanooat merupakan injeksi jangka panjang antipsikotik digunakan pada penderita skizofrenia. Penggunaan jangka panjang akan meningkatkan stress oksidatif yang berdampak kerusakan sel. Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu parameter stress oksidatif. Ekstrak kulit manggis mengandung xantin sebagai antioksidan yang dapat menghambat proses stress oksidatif.

Metode: Penelitian *true experimental* dengan *post test only control gorup design*. Sampel tikus jantan galur wistar, umur 3 bulan, berat badan 170-230 g, sehat, perlakuan selama 8 minggu. Kelompok kontrol (K1) injeksi *sesame oil*, kelompok perlakuan (P1) injeksi flufenazin dekanooat 2mg/KgBB, kelompok perlakuan (P2) injeksi flufenazin dekanooat 2mg/KgBB dan ekstrak kulit manggis 600mg/KgBB. Kadar MDA di analisa dengan spektrofotometer panjang gelombang 545 nm.

Hasil: Kadar MDA rerata±SB kadar MDA tiap kelompok adalah K=6.52±1.03, P1=7.47±1.26, P2=6.44±0.78. dan terdapat perbedaan bermakna antar kelompok ($p<0.05$).

Simpulan: Terdapat efek ekstrak kulit manggis terhadap penurunan kadar MDA pada tikus terpapar flufenazin dekanooat.

Kata kunci: ekstrak manggis, flufenazin dekanooat, MDA

PENDAHULUAN

Flufenazin dekanooat adalah obat neuroleptik bagi skizofrenia kronik yang diberikan jangka panjang. Pemberian flufenazin dekanooat secara intramuskuler maupun subkutan. Flufenazin dekanooat bekerja di sistem saraf pusat dan beberapa organ.¹ Pada pengobatan penderita skizofrenia kronik biasanya pengobatan dilakukan dalam waktu yang lama karena antipsikotik digunakan sebagai pengendali sifat. Menurut Damian, obat yang diberikan dalam jangka panjang dapat meningkatkan

jumlah stres oksidatif. Tubuh memiliki mekanisme pertahanan terhadap peningkatan stres oksidatif, namun ketidakseimbangan antara antioksidan yang di produksi tubuh dan stres oksidatif menimbulkan penyakit pada tubuh. Peningkatan stres oksidatif menginduksi kerusakan DNA dan makromolekul sehingga dapat berkembang menjadi penyakit kardiovaskuler, alzheimer, stroke, dan kanker.² Untuk mengetahui kadar stres oksidatif di dalam tubuh, dapat diukur dengan malondialdehid (MDA).³

Malondialdehid terdapat di darah dan merupakan senyawa thiobarbiturat produk

utama reaksi radikal bebas dan lipid.^{4,5,6} Salah satu cara untuk mencegah kerusakan sel karena peningkatan stres oksidatif dengan meningkatkan aktivitas pertahanan biologis melalui antioksidan. Cara yang mudah untuk meningkatkan antioksidan yaitu diet mengandung tinggi antioksidan.⁷

Manggis adalah tanaman tropis terdapat di Indonesia.^{1,2} Kulitnya berwarna hitam ungu hingga merah ungu, dagingnya berwarna putih, berbentuk bulat dengan diameter 5-7cm.¹ Di Indonesia manggis merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Berbeda dengan buah-buahan lainnya keunggulan tanaman manggis terletak pada kulit buahnya.² Kulit manggis mengandung komponen bioaktivitas yaitu polifenol seperti xantin, flavonoid, benzofenol.^{8,10,11} Berdasarkan penelitian, kulit manggis memiliki kadar xantin yang tinggi sebagai antioksidan.^{9,10,11,12,13}

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek pemberian ekstrak kulit manggis terhadap MDA darah tikus terpapar flufenazin dekanat.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bersama Fakultas Kedokteran UNDIP pada selama 8 minggu. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only controlled group design*. Populasi adalah tikus wistar jantan umur 3 bulan, berat badan 170-230 gram, tampak sehat. Sampel diambil 15 ekor secara *simple random sampling*. Ekstrak kulit manggis diperoleh dari apotek dan diberikan pada dosis 600 mg/KgBB/hari secara oral, flufenazin dekanat diperoleh dari apotek dan diberikan pada dosis 2

mg/KgBB/minggu secara injeksi intramuskuler. Setelah adaptasi 1 minggu, tikus dibagi ke dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif yang diberi diet basal (K), kelompok yang diberi diet basal dan injeksi flufenazin dekanat (P1), dan kelompok yang diberi diet basal, injeksi flufenazin dekanat dan ekstrak kulit manggis (P2). Penelitian dilakukan selama 8 minggu. Setelah 8 minggu seluruh sampel dikorbankan dengan menggunakan eter dan diambil darahnya melalui aorta, kemudian dilakukan pemeriksaan kadar MDA dengan metode TBARS.

Analisis data

Untuk melihat efek ekstrak kulit manggis terhadap kadar MDA darah tikus wistar terpapar flufenazin dekanat, maka masing-masing perlakuan dilakukan uji statistik dengan menggunakan program komputer *IBM SPSS Stastitics 22 for Windows*. Data akan dinilai sebaran distribusinya dengan uji *Saphiro Wilk* dan kesamaan varians dengan uji varians (*Levene's Test*) lalu dilanjutkan dengan *one-way ANNOVA* kemudian dilanjutkan dengan *post hoc* dengan derajat kepercayaan 95%.

HASIL

MDA merupakan senyawa thiobarbiturat produk utama reaksi radikal bebas dan lipid yang terdapat di darah serta digunakan sebagai salah satu parameter untuk menilai stres oksidatif. Pengaruh pemberian ekstrak kulit manggis terhadap MDA darah tikus wistar terpapar flufenazin dekanat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata kadar MDA darah

Kelompok	Rerata kadar MDA±SB(mmol/L)	Uji Normalitas (Nilai p)
K (n=5)	6.52±1.03	0.302*
P1 (n=5)	7.47±1.26	0.366*
P2 (n=5)	6.44±0.78	0.776*

*Shapiro-Wilk

Rerata kadar MDA pada kelompok K digunakan sebagai nilai normal. Terdapat peningkatan rerata kadar MDA kelompok P1 dibanding dengan kelompok P2. Hal ini menunjukkan bahwa tikus wistar terpapar flufenazin dekanoat meningkatkan kadar MDA darah. Rerata kadar MDA kelompok P2 lebih rendah dari K dan P1, hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit manggis *ad libitum* juga menurunkan kadar MDA darah.

Setelah melakukan analisis deskriptif pada data lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan, yang berdistribusi normal (Tabel 1), dan varians datanya normal (p=0,716), uji *one-way ANNOVA* dipilih untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok. Uji *one-way ANNOVA* kadar MDA darah menunjukkan paling tidak terdapat perbedaan kadar MDA yang bermakna pada dua kelompok (p=0,000). untuk mengetahui perbedaan yang bermakna pada kadar MDA, maka dilanjutkan analisis *post hoc* LSD.

Tabel 2. Hasil uji komparasi *post hoc* LSD kadar MDA darah

	K	P1	P2
K		0,173	0,000*
P1	0,173		
P2	0,000*	0,000*	0,000*

*perbedaan bermakna

Pada penelitian didapatkan kadar MDA kelompok K dan P1 lebih tinggi bermakna dari kelompok P2. Kadar MDA kelompok

P2 lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok K dan P1.

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek pemberian ekstrak kulit manggis *ad libitum* sebagai antioksidan terhadap kadar MDA darah tikus wistar terpapar flufenazin dekanoat. Penelitian yang sudah dilakukan menggunakan vitamin E. Pada penelitian ini digunakan ekstrak kulit manggis yang diberikan *ad libitum* agar lebih aplikatif dan mudah diterapkan pada pola konsumsi masyarakat keseharian. Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Faktor lain yang meliputi jenis kelamin, usia, dikendalikan menggunakan hewan coba 1 galur, semua berkelamin jantan dengan kondisi sehat. Efek pemberian ekstrak kulit manggis pada penelitian ini merupakan efek xantin sebagai antioksidan eksogen alami yang dapat menurunkan stres oksidatif.

Konsumsi obat dalam jangka panjang meningkatkan stres oksidatif yang dapat menginduksi kerusakan DNA dan makro molekul sehingga dapat berkembang menjadi penyakit kardiovaskuler, alzaimer, stroke, dan kanker.²

Hasil penelitian didapatkan kadar MDA darah kelompok P1 lebih tinggi dan bermakna secara statistik menggunakan *one-way ANOVA* daripada kelompok K1. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian penggunaan obat jangka panjang yang

menginduksi stres oksidatif.² Selain itu juga dipengaruhi oleh genetik, oksidasi fosforilasi, sinar ultraviolet, dan olah raga berlebih.¹⁴

Peningkatan kadar MDA dapat dicegah melalui berbagai macam cara, salah satunya melalui diet antioksidan eksogen alami. Kulit manggis merupakan sumber antioksidan eksogen alami. Penelitian Ni Putu (2014) memperlihatkan penurunan kadar MDA pada tikus wistar yang mengkonsumsi etanol dengan pemberian ekstrak kulit manggis selama 14 hari.¹⁴ Hasil penelitian didapatkan kadar MDA P2 lebih rendah secara bermakna menggunakan *one-way* Anova maupun *post hoc* LSD dari kelompok P1 dan K.

SIMPULAN

Ekstrak kulit manggis dosis 600mg/KgBB/hari mempengaruhi penurunan kadar MDA pada tikus wistar terpapar flufenazin dekanat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada ketua bagian Biokimia FK UNDIP, penanggung jawab dan analis laboratorium Biokimia FK UNDIP, penanggung jawab Laboratorium Parasitologi FK UNDIP dan asisten mahasiswa angkatan 2012 Biokimia FK UNDIP.

DAFTAR PUSTAKA

1. FLUPHENAZINE DECANOATE INJECTION, USP.
2. Deavall DG, Martin EA., Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*;2012;Article ID 645460:1-13
3. Morera AL, Intxausti A, Abreu-gonzalez P. Winter/summer seasonal changes in malondialdehyde formation as a source of variance in oxidative stress schizophrenia research. *World J Biol Psychiatry*; 2009;10(4 Pt 2):576-580
4. Stancliffe R a., Thorpe T, Zemel MB. Dairy attenuates oxidative and inflammatory stress in metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:422–430.
5. Souza JR., Tácio Pessoa de; Oliveira, Paulo Roberto de and Pereira, Benedito. Physical exercise and oxidative stress. Effect of intense physical exercise on the urinary chemiluminescence and plasmatic malondialdehyde. *Rev Bras Med do Esporte*. 2005;11(1): 91-96
6. Cighetti G, Allevi P, Anastasia L, Bortone L, Paroni R. Use of methyl malondialdehyde as an internal standard for malondialdehyde detection: Validation by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2002;48:2266–9.
7. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*. 2006;545:51–64.
8. Zadernowskia Ryszard, Czaplickia Sylwester, Naczka Marian. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chem*;2009;112(3):685-689
9. Sie, Jessica Oeinitan. Daya antioksidan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) Hasil Pengadukan dan Reflux. *Calyptra Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*. 2013;2(1):1–10
10. Widowati W, Darsono L, Suherman J, Yellianty Y. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis, Antioxidant, Antiaggregation of Mangosteen Peel Extract (*Garcinia mangostana* L.). 2014;4(6):458–66.
11. Coloschi M, Gomez G, Valdez M, Reichert B, Mitre J, Aires B. the Effect of Processing Variables on High Strength. 2013;2:1805–14.
12. Palakawong CE Al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) parts and some essential oils. *Int Food Res*

- J [Internet]. 2010;17:583–9. Available from: <http://www.ifrj.upm.edu.my/17%20%2803%29%202010/IFRJ-2010-583-589%20Choothawee%20Thailand.pdf>
13. Tjahjani S, Widowati W, Khiong K, Suhendra A, Tjokropranoto R. Antioxidant Properties of *Garcinia Mangostana* L (Mangosteen) Rind. *Procedia Chem* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2014;13(2009):198–203. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619614002162#>
 14. Pascasarjana P, Udayana U. Program pascasarjana universitas udayana denpasar 2014.
 15. Yang W, Etanol M. *Cakra Kimia* (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry) Volume 2, Nomor 2, Oktober 2014. 2014;2:20–24.

PENENTUAN PATOTIPE VIRUS NEWCASTLE DISEASE PADA AYAM KAMPUNG DENGAN METODE RT-PCR DAN REA

Wahyu Haryanto¹ dan Aris Haryanto²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: wahyu.grimjow@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: *Newcastle Disease* merupakan penyakit viral pada unggas yang disebabkan oleh virus *Newcastle Disease* (ND). Virus ND merupakan virus dengan materi genetik *ss*-RNA, *sense* negatif, mempunyai amplop dan tidak bersegmen. Infeksi oleh virus ND pada unggas, terutama ayam menyebabkan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi tergantung dari patotipe virus ND yang menginfeksi. Penentuan patotipe virus ND yang cepat, sangat dibutuhkan terutama dalam usaha pencegahan dan pengendalian penyakit ND pada unggas. Penelitian ini bertujuan membandingkan hasil penentuan patotipe virus ND pada ayam kampung dengan metode RT-PCR dan REA yang menggunakan enzim endonuklease restriksi *Hin11*, dengan metode sekuensing DNA pada gen penyandi protein F virus ND yang telah umum digunakan sebagai metode penentuan patotipe virus ND. Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu didapatkannya metode yang lebih cepat serta akurat dalam penentuan patotipe virus ND.

Metode: Sebanyak empat isolat virus ND yang diisolasi dari ayam kampung dan satu isolat virus ND sebagai kontrol positif digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Ekstraksi dilakukan dari kelima sampel tersebut untuk mendapatkan RNA virus yang digunakan sebagai *template* pada proses amplifikasi gen penyandi protein F virus ND dengan metode RT-PCR. Produk RT-PCR kemudian divisualisasikan pada gel agarose 1,2%. Dengan metode *restriction endonucelase analysis* (REA), selanjutnya produk RT-PCR yang muncul dipotong dengan enzim *Hin11* dan divisualisasikan pada gel agarose 2,5% untuk diamati pola fragmen DNAny. Di sisi lain produk RT-PCR dipurifikasi dan sekuensing untuk dianalisis sekuen gen penyandi protein F virus ND.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari hasil amplifikasi pada kelima sampel isolat virus ND yang digunakan, muncul fragmen DNA sebesar 363 bp yang merupakan produk RT-PCR pada semua sampel. Hasil pemotongan fragmen DNA pada kelima sampel tersebut dengan enzim *Hin11* menunjukkan bahwa empat isolat ND yang diisolasi dari ayam kampung merupakan virus ND dengan patotipe virulen, sedangkan pada kontrol positif merupakan virus ND yang avirulen. Hasil penentuan patotipe virus ND pada ayam kampung dengan metode RT-PCR dan REA ini juga menunjukkan kesesuaian yang tinggi dengan hasil patotipe virus ND dengan metode sekuensing DNA yang sudah umum digunakan. Metode RT-PCR dan REA dengan enzim *Hin11* ini memiliki keunggulan dalam hal kecepatan hasil (± 1 hari), sedangkan metode patotipe konvensional membutuhkan waktu $\pm 3-8$ hari.

Simpulan: Metode RT-PCR dan REA dengan enzim *Hin11* ini diharapkan dapat digunakan sebagai metode diagnosis rutin pada kasus infeksi virus ND pada ayam kampung yang ditemukan di lapangan.

Kata kunci: *Newcastle disease*, RT-PCR, REA, sekuensing DNA, ayam kampung

PENDAHULUAN

Newcastle Disease merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh infeksi virus *Newcastle Disease* (ND). Virus ND termasuk ke dalam genus *Avulavirus*, famili *Paramyoviridae*, beramplop, *ss-RNA sense* negatif tidak bersegmen dengan ukuran genom 15.2 kb. Virus ini memiliki 6 gen penyandi protein struktural yaitu RNA-*direct* RNA polymerase (L), hemagglutinin-neuraminidase (HN), protein fusi (F), protein matriks (M), fosfoprotein (P) dan nukleoprotein (NP). Virus ND dibedakan ke dalam 4 patotipe atau strain berdasarkan virulensinya yaitu strain *Viscerotropic Velogenic* (*Doyle's form*), strain *Neurotropic Velogenic* (*Beach's form*), strain *Mesogenic* (*Beaudette's form*) dan Strain *Lentogenic*.^{1,2}

Metode penentuan patotipe virus ND konvensional mengikuti protokol *mean death time* (MDT) pada telur ayam berembrio serta *intracerebral pathogenecity index* (ICPI) dan *intravenous pathogenecity index* (IVPI) pada ayam umur 1 hari dan 6 minggu. Pada tingkat molekuler, *Office International des Epizooties* (OIE) telah menyepakati bahwa sekuen asam amino pada daerah *cleavage site* protein F dapat digunakan sebagai penentu patotipe virus ND. Virus ND strain avirulen memiliki motif dua asam amino basa tunggal serta leusin (L) pada posisi asam amino ke-117, sedangkan virus ND strain virulen memiliki motif sekuen sepasang asam amino basa lisin (K) atau arginin (R) pada posisi asam amino ke-112/113 dan 115/116 yang diikuti dengan fenilalanin (F) pada asam amino ke-117. Banyaknya residu asam amino basa pada daerah *cleavage site* memiliki korelasi dengan virulensi atau patogenesitas virus ND.^{3, 4, 5, 6, 7}

Mengingat penyakit ND sangat menular, maka deteksi dan identifikasi cepat virus ini sangat dibutuhkan untuk efektivitas kontrol dan eradikasi penyakit sehingga dibutuhkan metode

uji untuk menentukan patotipe. Uji patogenesitas *in vivo* seperti ICPI, IVPI dan MDT dapat digunakan untuk membedakan strain virus yang virulen dan avirulen namun membutuhkan waktu yang lama dan membutuhkan banyak tenaga, serta cukup mahal. Sebaliknya, metode RT-PCR menawarkan beberapa keuntungan dibanding metode uji penentuan patotipe konvensional. Kecepatan diagnosa dapat ditingkatkan hingga satu hari dan memungkinkan identifikasi cepat dari jumlah sampel yang banyak. Keuntungan lain dari metode RT-PCR adalah dapat dilanjutkan dengan metode lain seperti sekuensing DNA ataupun restriksi enzim (REA) pada produk PCR tersebut. Pada teknik RT-PCR-REA, perbedaan pola hasil pemotongan DNA dengan enzim *HinI* produk RT-PCR antara virus ND strain virulen dan avirulen memungkinkan interpretasi hasil yang cepat dan akurat.^{7,8}

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen penyandi protein F virus ND pada penentuan patotipe virus dari isolat lapangan ayam kampung di daerah D.I. Yogyakarta serta membandingkan hasil RT-PCR-REA dengan hasil sekuensing DNA yang sudah umum digunakan untuk penentuan patotipe virus ND pada ayam. Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu mendapatkan metode diagnosa yang lebih cepat, sederhana serta akurat untuk penentuan patotipe virus *Newcastle Disease* serta mendapatkan informasi genetik mengenai isolat virus lokal yang dapat digunakan untuk kepentingan program vaksinasi dan pemberantasan penyakit, epidemiologi molekuler serta analisis perubahan genomik.

METODE

Sampel

Sampel yang digunakan berupa isolat hasil propagasi dan isolasi virus ND pada telur

ayam berembrio/TAB oleh BBVet Wates. Isolat merupakan sampel kasus pada tahun 2012-2013 yang berasal dari lokasi sekitar D.I. Yogyakarta. Kontrol positif berasal dari isolat virus ND pada ayam broiler dan telah dikarakterisasi oleh BBVet Wates. Daftar sampel isolat virus ND pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian memerlukan waktu dua bulan mulai dari Mei 2014 hingga Juli 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, meliputi proses amplifikasi (RT-PCR), elektroforesis dan visualisasi menggunakan UV Transluminator serta proses pemotongan DNA dengan enzim restriksi *Hin11* (REA).

Amplifikasi gen F dengan metode RT-PCR

Proses amplifikasi menggunakan *Transcriptor One-Step* RT-PCR kit (Roche) serta menggunakan spesifik primer A dan B. Komposisi larutan RT-PCR terdiri dari *Reaction Buffer* 5 µl, *Enzym mix* 0.5 µl, *Template* (isolat sampel) 2 µl, *Primer A* 1 µl, *Primer B* 1 µl dan *water* (H₂O) 15.5 µl. Program RT-PCR meliputi proses *RT/Reverse Transcription* suhu 50°C selama 30 menit, dihubungkan dengan program PCR dengan profil *Initial Denaturation* suhu 94°C selama 7 menit; *Denaturation* suhu 94°C selama 10 detik; *Annealing* suhu 50°C selama 30 detik; *Extention* suhu 68°C selama 30 detik; dan *Final Extention* suhu 68°C selama 7 menit, berulang dalam 40 kali siklus.

Elektroforesis produk RT-PCR

Proses elektroforesis dilakukan pada gel agarose konsentrasi 1.2%. Komposisi *loading* pada gel agarose terdiri dari produk RT-PCR 5 µl, *Nuclease-free water* 3.5 µl, dan *loading Dye DNA* 1.5 µl. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 80 volt selama ± 30 menit.

Restriction endonuclease analysis (REA) produk RT-PCR

Proses restriksi enzim dimulai dengan pembuatan larutan dengan komposisi produk RT-PCR 4 µl, *Buffer-G* 1 µl, *Enzym Hin11* 1 µl, dan *Nuclease-free water* 14 µl untuk tiap isolat sampel. Larutan kemudian diinkubasi pada *shaker waterbath* suhu 37°C selama kurang lebih 3 jam.

Elektroforesis produk REA

Proses elektroforesis dilakukan pada gel agarose konsentrasi 2.5%. Komposisi *loading* pada gel agarose terdiri dari produk REA 7.5 µl dicampur dengan *loading dye DNA* 1.5 µl. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 80 volt selama ± 30 menit.

Sekuensing DNA

Proses sekuensing DNA dilakukan dengan mengirimkan produk RT-PCR ke PT. Genetika Science Indonesia melalui metode terminasi enzimatik/metode Sanger. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan Program *Molecular Evolution Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.06 dan program *CLC Sequence Viewer* 7.5.

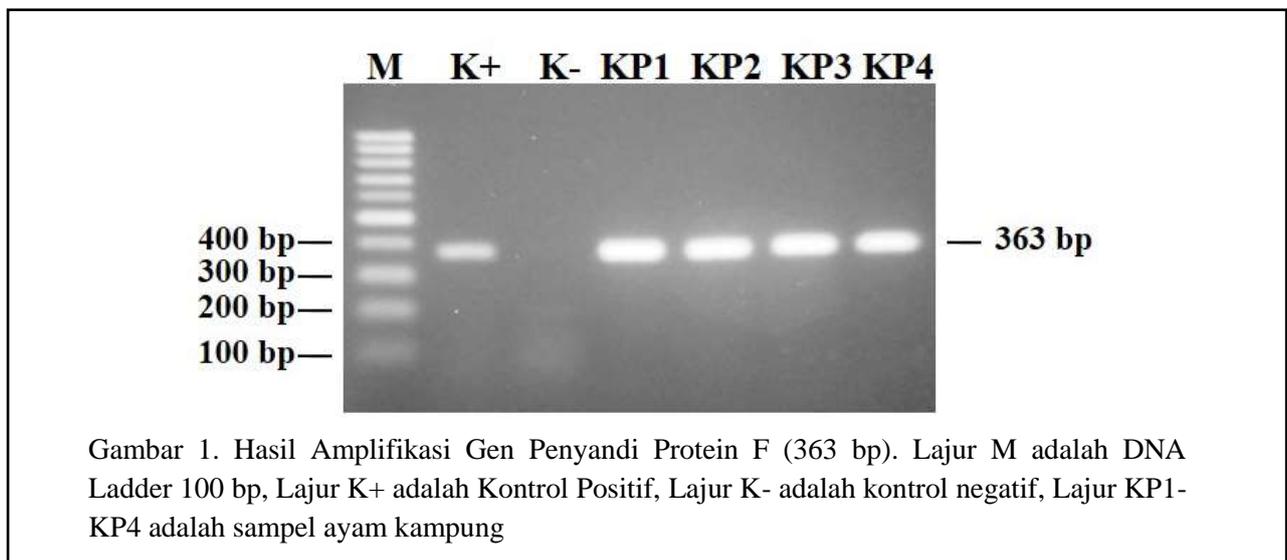
Tabel 1. Daftar sampel isolat virus ND pada penelitian ini

No Sampel	Kode Sampel	Asal Hewan	Asal Sampel
KP1	0366/03/2013	Ayam Kampung	Bambanglipuro, Bantul
KP2	0663/04/2013	Ayam Kampung	Galur, Kulon Progo
KP3	1860/11/2012	Ayam Kampung	Pengasih, Kulon Progo
KP4	1406/08/2013	Ayam Kampung	Trirenggo, Bantul

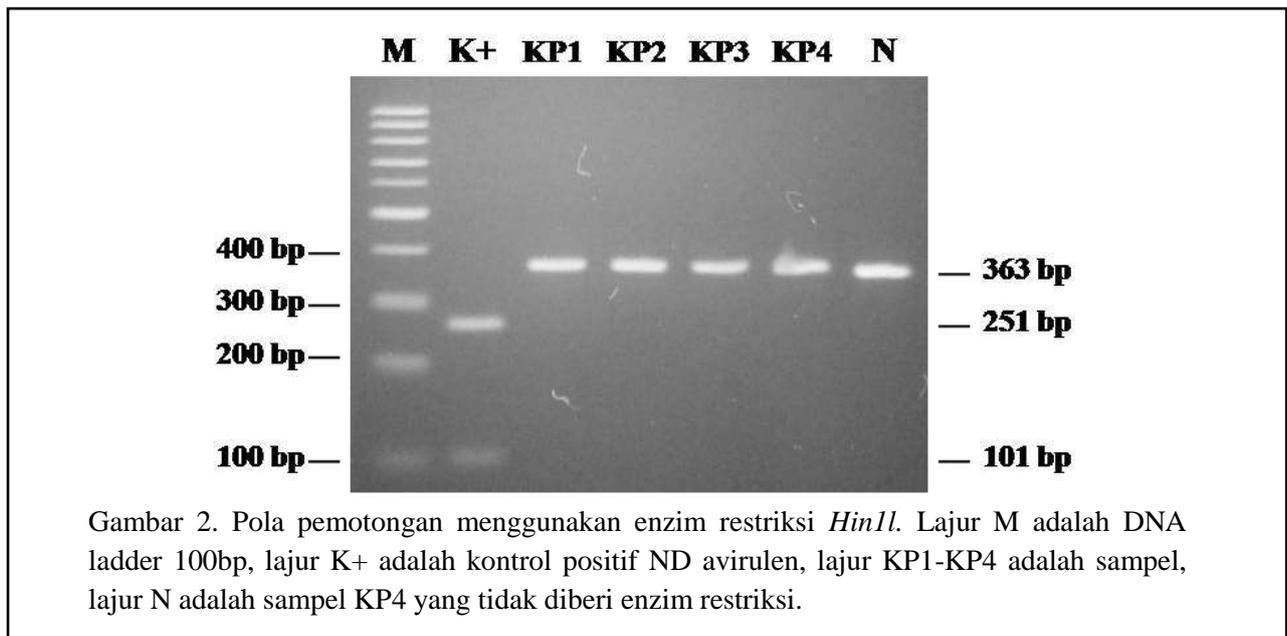
HASIL

Empat isolat virus ND yang telah diterima selanjutnya dilakukan proses *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan kit *one-step* RT-PCR (Roche). Selain keempat isolat sampel, pada proses RT-PCR juga disertakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif berisi isolat sampel virus ND yang berasal dari ayam broiler yang telah dikarakterisasi oleh BBVET Wates dan diidentifikasi sebagai virus *Newcastle Disease* strain Lentogenik atau

avirulen. Pada kontrol negatif, *template* DNA digantikan oleh akuades PCR-*grade*. Merujuk pada penelitian Kant *et al.* (1997) pada proses RT-PCR digunakan sepasang spesifik Primer A (5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3') dan Primer B (5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3') sehingga menghasilkan produk RT-PCR sebesar 363 bp. Primer ini dapat digunakan untuk identifikasi patotipe virus ND karena mengapit daerah *cleavage site* protein F (asam amino ke 112-117).⁹ Hasil amplifikasi keempat isolat sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen Penyandi Protein F (363 bp). Lajur M adalah DNA Ladder 100 bp, Lajur K+ adalah Kontrol Positif, Lajur K- adalah kontrol negatif, Lajur KP1-KP4 adalah sampel ayam kampung



Gambar 2. Pola pemotongan menggunakan enzim restriksi *Hin11*. Lajur M adalah DNA ladder 100bp, lajur K+ adalah kontrol positif ND avirulen, lajur KP1-KP4 adalah sampel, lajur N adalah sampel KP4 yang tidak diberi enzim restriksi.

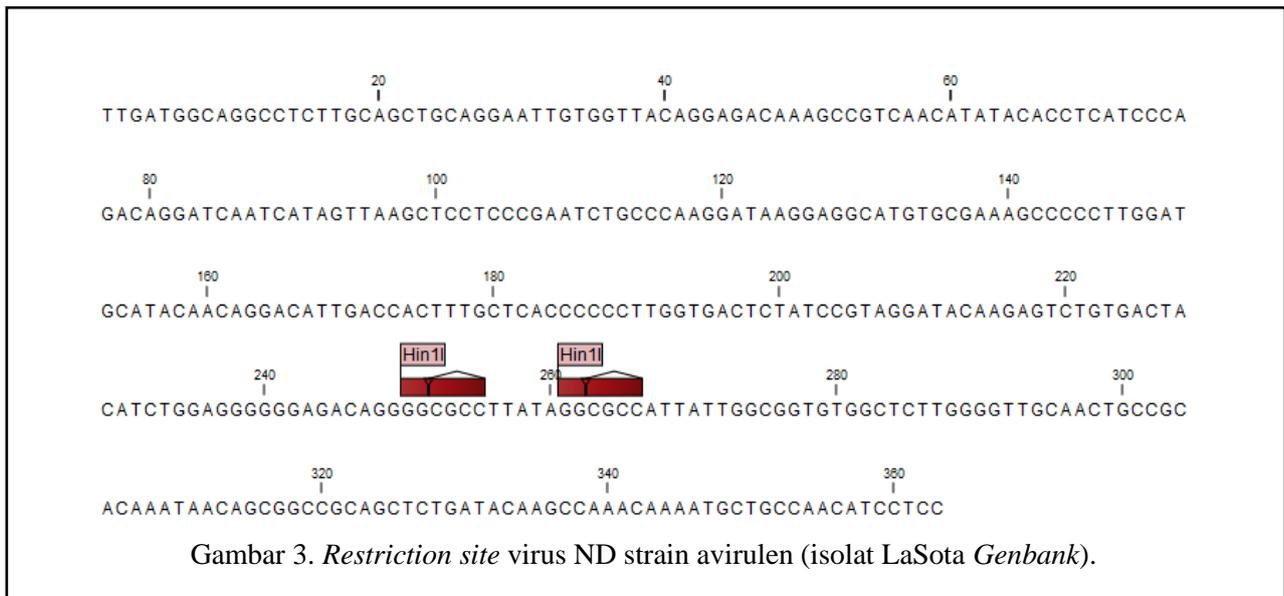
Proses dilanjutkan dengan identifikasi patotipe isolat tersebut menggunakan metode *Restriction Endonuclease Analysis* (REA). Penelitian ini menggunakan enzim *Hin11* sebagai enzim restriksi. Hasil pemotongan dengan metode REA dapat dilihat pada Gambar 2.

PEMBAHASAN

RT-PCR dengan primer A+B mengkonfirmasi bahwa semua isolat sampel yang diperoleh terdeteksi positif ND. Dari hasil elektroforesis produk RT-PCR dapat terlihat kontrol positif (K+) dan isolat sampel KP1-KP4 memiliki fragmen DNA dengan besar 363 bp yang merupakan produk amplifikasi dari

fragmen gen target penyandi protein F virus ND.⁹

Pada proses REA digunakan Enzim *Hin11* yang berasal dari bakteri *Haemophylus influenza* RFL1. Menurut Mase dan Kanehira (2012), enzim restriksi ini dapat membedakan virus ND virulen dan avirulen berdasarkan pola pemotongannya. Enzim ini akan memotong pada urutan nukleotida 5'...G R↓ C G Y C...3' dan 3'...C Y G C↓R G...5' dimana R adalah basa purin yaitu adenin atau guanin (A/G) dan Y adalah basa pirimidin yaitu sitosin atau timin (C/T).⁸ Analisis lokasi pemotongan atau *restriction site* dari enzim *Hin11* dilakukan menggunakan program *CLC Sequence Viewer 7.5*. Posisi *restriction site* dari enzim *Hin11* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. *Restriction site* virus ND strain avirulen (isolat LaSota Genbank).

Virus ND virulen tidak memiliki *restriction site Hin11*, sehingga tidak terpotong oleh pemberian enzim ini setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Virus ND avirulen memiliki 2 *restriction site Hin11* yaitu pada nukleotida nomor 251 dan 262 sehingga menghasilkan 3 pola pemotongan dengan besar 11 bp, 101 bp, dan 251 bp. Hal ini berbeda

dengan temuan Mase dan Kanehira (2012), dengan menggunakan primer berbeda menemukan 3 *restriction site* dengan 4 potongan fragmen DNA pada strain virus ND avirulen, sedangkan pada strain virulen tidak terdapat *restriction site* sama sekali sehingga tidak terdapat adanya pola pemotongan.⁸

Pada elektroforesis produk RT-PCR-REA diperoleh gambaran isolat strain virulen (KP1, KP2, KP3, KP4) tidak memiliki *restriction site* sehingga produk RT-PCR tersebut tidak terpotong (hanya terlihat satu fragmen DNA dengan ukuran 363 bp). Sebaliknya pada kontrol positif (K+) yang menggunakan isolat virus ND dari ayam broiler memperlihatkan adanya dua fragmen DNA yang masing-masing berukuran 251 bp dan 101 bp sehingga termasuk ke dalam strain avirulen. Isolat KP1, KP2, KP3, dan KP4 secara tegas termasuk ke dalam strain virulen karena tidak membentuk potongan fragmen DNA seperti halnya pada kontrol positif. Seharusnya dapat terlihat tiga fragmen DNA pada hasil elektroforesis tersebut jika isolat merupakan strain virus ND virulen, namun karena ukuran fragmen DNA yang ke-3 sangat kecil (11 bp) sehingga tidak memungkinkan untuk divisualisasi bersama dengan dua fragmen DNA lainnya pada medium gel agarose. Jumlah dan besar potongan fragmen DNA yang terbentuk pada hasil restriksi dengan enzim *Hin11* disajikan pada Tabel 2.

Analisis pada level molekuler selanjutnya dilakukan dengan sekuensing produk RT-PCR dari keempat isolat sampel virus ND. Senada dengan yang dikemukakan oleh Kant *et al.* (1997) bahwa metode RT-PCR yang dikombinasikan dengan sekuensing nukleotida juga dapat digunakan untuk diagnosa cepat *Newcastle disease* serta untuk memprediksi patotipe isolat virus ND tersebut, baik strain virulen, moderat virulen dan avirulen berdasarkan motif yang terlihat pada daerah *cleavage site* protein F.⁹ Menurut Fazel *et al.* (2012), protein fusion (F) yang dikode oleh gen F akan membelah menjadi F₂-F₁ protein lewat pembelahan translasional menggunakan protease sel hospes. Tipe virus ND virulen memiliki *multiple* asam amino basa pada *cleavage site* protein F sehingga dapat dikenali

oleh berbagai protease sel hospes. Oleh sebab itu prediksi patotipe dan diagnosa virulensi virus ND dapat dilakukan menggunakan analisis sekuen daerah *cleavage site* tersebut.¹⁰

Hasil sekuensing dianalisa menggunakan program *Molecular Evolution Genetics Analysis* (MEGA). Analisis sekuensing dilakukan untuk mengetahui kesesuaian antara sampel positif pada penelitian ini dengan *database* yang terdapat di *Genbank* serta meneguhkan metode penentuan patotipe virus ND dengan RT-PCR-REA dengan menganalisis motif asam amino penyusunnya. Pada penelitian ini digunakan enam sekuen virus ND dari *Genbank* sebagai pembanding yaitu isolat Bali, Sukorejo, Japan, Japan Anas, China, dan Taiwan. Urutan asam amino hasil sekuensing virus ND pada Sampel KP1, KP2, KP3 dan KP4 serta perbandingan dengan *database Genbank* pada daerah *cleavage site* (asam amino ke112-117) dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan penelitian Qin *et al.*, (2008) dan Leeuw *et al.*, (2003), virus ND yang bersifat virulen akan memiliki sekuen asam amino ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R¹¹⁶ pada C terminus F₂ protein dan fenilalanin (F) pada residu 117 di N-terminus F₁ protein. Berbeda dengan sekuen pada strain avirulen yang memiliki motif asam amino ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R¹¹⁶ pada C-terminus F₂ protein dan Leusin (L) pada residu asam amino 117.^{5, 11} Menurut petunjuk yang dikeluarkan oleh Organisasi Kesehatan Hewan Dunia/ OIE (2012), virus ND virulen memiliki sekuen asam amino ¹¹²R/G/K-R-Q/K-K/R-R¹¹⁶ pada C-terminus protein F₂ dan fenilalanin (F) pada residu 117 di N-terminus protein F₁, dibandingkan dengan sekuen ¹¹²G-R/K-Q-G-R-L¹¹⁷ pada *cleavage site* virus ND avirulen.¹³

Tabel 2. Pola pemotongan produk RT-PCR menggunakan enzim restriksi *Hin1I*

Enzim restriksi	Restriction Site	Perkiraan Besar Produk
Hin1L	5'...G R C G Y C...3' 3'...C Y G C R G...5'	Virulen : tidak terpotong (363 bp) Avirulen : 11 bp, 101 bp, 251 bp

Tabel 3. Karakteristik patotipe virus ND pada penelitian ini

No. Sampel	Asam Amino 112-117	Patotipe
Taiwan AFQ37832.1	G-R-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
China KJ607168.1	G-R-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
Japan Anas AGP25375.1	G-K-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
Japan AGP25373.1	G-K-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
Sukorejo HQ697255.1	R-R-R-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>
Bali AB605247.1	R-R-Q-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>
La Sota AHZ18333.1	G-R-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
BR1 (Kontrol +)	G-R-Q-G-R-L	Avirulen / <i>Lentogenik</i>
KP1	R-R-Q-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>
KP2	R-R-R-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>
KP3	R-R-Q-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>
KP4	R-R-Q-K-R-F	Virulen / <i>Mesogenik</i>

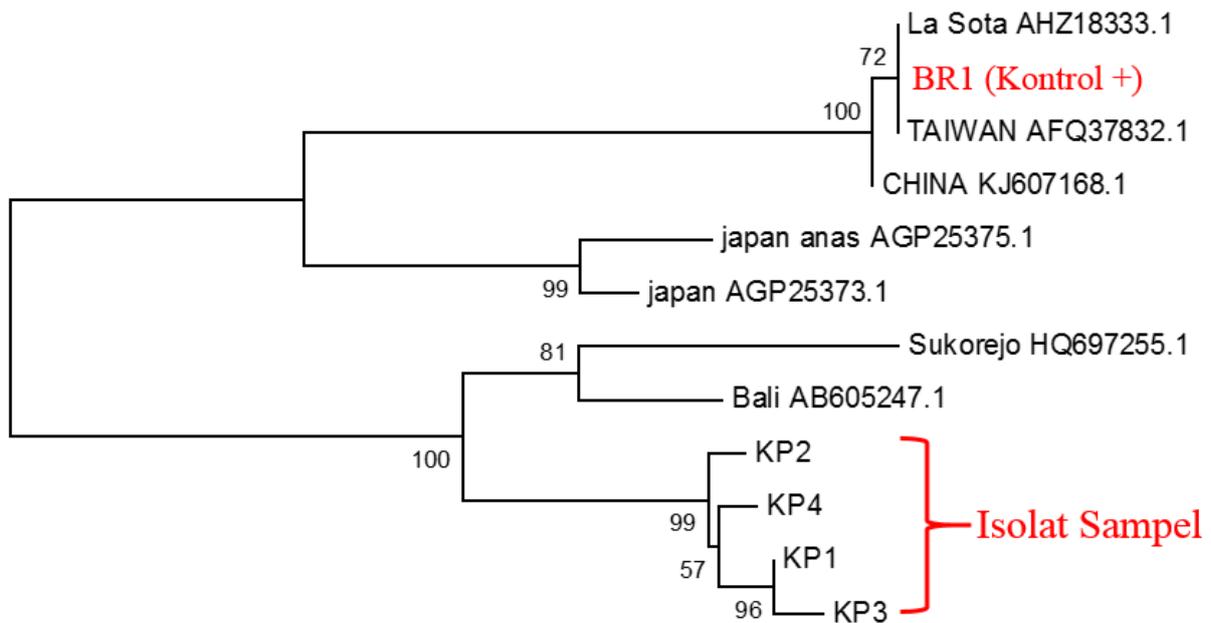
Keterangan : Asam amino basa
 Phenilalanin
 Leusin

Berdasarkan hasil sekuensing dapat diidentifikasi bahwa keempat isolat virus ND yang berasal ayam kampung tersebut merupakan virus *Newcastle Disease* strain virulen / mesogenik. Hal ini dapat diketahui berdasarkan sekuen protein dimana pada semua sampel terlihat asam amino pada posisi ke-117 menunjukkan F (fenilalanin). Hal yang sama ditunjukkan pada isolat Bali dan Sukorejo yang telah dikarakterisasi sebagai strain virus virulen. Hal berbeda ditunjukkan misalnya pada isolat LaSota yang merupakan strain avirulen / lentogenik dan umum digunakan untuk pembuatan vaksin ND, ditunjukkan dengan sekuen L (leusin) pada urutan asam amino ke-117. Sama halnya dengan isolat Japan, China, dan Taiwan yang merupakan strain avirulen karena memiliki motif leusin pada asam amino posisi ke-117.

Oberdorfer dan Werner (1998) serta Ahmadi *et al.*, (2013) mengemukakan bahwa selain berdasarkan pada asam amino ke-117, virulensi virus ND dapat pula terlihat dengan adanya *multiple* asam amino basa pada daerah *cleavage site* gen penyandi protein F. Semakin banyak asam amino basa (R/arginin atau K/lisin) yang terdapat pada daerah tersebut maka akan semakin mudah pula *cleavage site* tersebut terpotong oleh berbagai macam enzim protease sel hospes sehingga mempermudah dalam virulensi virus ke hospes. Terdapat korelasi antara virulensi atau patogenesis virus ND dengan banyaknya residu asam amino basa pada daerah *cleavage site* F₀.^{3,7} Hasil sekuensing asam amino pada isolat LaSota, Taiwan, China, dan Japan hanya memiliki 2 asam amino basa tunggal pada daerah *cleavage site* 112-117. Berbeda halnya

dengan isolat Bali dan sampel Ayam kampung (KP1, KP3, KP4) yang memiliki empat asam amino basa (2 pasang asam amino basa). Terlebih pada sampel ayam kampung (KP4) yang memiliki 5 asam amino basa (motif sama dengan isolat Sukorejo). Dengan metode sekuensing dapat diidentifikasi bahwa isolat

sampel KP1, KP2, KP3 dan KP4 termasuk ke dalam strain virulen mesogenik. Pohon filogenetik isolat virus ND dari ayam kampung dibandingkan dengan isolat dari *database Genbank* menggunakan metode *neighbour joining* dengan *bootstrap* 1000 dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pohon filogenetik sampel dan perbandingan dengan *database Genbank*.

Terdapat kesesuaian hasil penentuan patotipe virus ND pada metode kombinasi RT-PCR-REA dengan metode analisis sekuensing produk RT-PCR yaitu keseluruhan isolat sampel virus ND KP1, KP2, KP3 dan KP4 merupakan strain virus virulen. Namun demikian, pada metode sekuensing produk RT-PCR mampu membedakan antara strain virulen mesogenik dengan strain virulen velogenik, sedangkan metode RT-PCR-REA terbatas

membedakan antara strain virus ND virulen dan avirulen saja. Meski demikian metode kombinasi RT-PCR-REA memiliki keunggulan dalam hal kecepatan waktu penentuan patotipe virus (Tabel 4) yang berkorelasi dengan kebutuhan diagnosis cepat patotipe virus ND di lapangan untuk penyusunan program pencegahan dan penanggulangan penyakit tersebut.

Tabel 4. Perbandingan waktu yang diperlukan pada penentuan patotipe virus ND dengan beberapa metode

Metode	RT-PCR-REA	MDT	ICPI	In vivo test (ICPI, IVPI)
Kecepatan	± 1 hari. ^{7,9,14}	Pengamatan	- Pengamatan sampai 8 hari. ^{12,13}	± 4-7 hari. ¹⁵
Hasil		3-4 hari	- Paling cepat 5 Hari. ⁹	

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa penentuan patotipe virus ND dapat dilakukan menggunakan metode kombinasi RT-PCR-REA menggunakan enzim *Hin11* pada produk amplifikasi DNA daerah *cleavage site* protein F. Terdapat kesesuaian hasil penentuan patotipe virus ND antara penggunaan metode RT-PCR-REA dengan metode analisa sekuensing DNA pada isolat sampel virus strain virulen asal ayam kampung. Metode RT-PCR-REA dapat diterapkan sebagai metode diagnosis cepat penentuan patotipe virus ND pada kasus lapangan (± 1 hari), sedangkan metode patotipe konvensional membutuhkan waktu $\pm 3-8$ hari.

Kedepan disarankan agar dipergunakan sampel lapangan murni tanpa dilakukan propagasi virus guna mengetahui efektifitas penentuan patotipe pada sampel dengan lot virus yang sedikit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates di Yogyakarta dan Kepala Bagian Biokimia, Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada (FKH-UGM) atas ijin penggunaan fasilitas laboratoriumnya. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UGM, Yogyakarta. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Hibah Kompetensi Tahun Anggaran 2014-2015 DP2M DIKTI Kemendiknas Republik Indonesia

DAFTAR PUSTAKA

1. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science. Blackwell Publishing Company. 2002:381-387.
2. Ahmadi E, Pourbakhsh SA, Ahmadi, M., Talebi, A. Pathotypic characterization of the Newcastle Disease virus isolated from commercial poultry in northwest Iran. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2014;38:383-387.
3. Oberdorfer A, dan Werner, O. Newcastle Disease virus : detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenecity. *Avian Pathology*.1998;27: 237-243.
4. Akram R, Rizvi F, Anjum AD, Mubarak A. Pathogenecity of field isolates of Newcastle Disease Virus. *Pakistan J Bio Sci.* 2000;3 (7): 1083-1085.
5. Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters PH. Effect of fuion protein cleavage site mutations on virulence of newcastle disease virus: non virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J General Virol.* 2003;84: 475-484.
6. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. Development of Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2004;329-338.
7. Ahmadi, E., Ahmadi, M., Pourbakhsh,S.A., Talebi, A. Detection and Differentiation of Newcastle Disease Virus Strain Affectig Commercial Poultry in Northwest of Iran Using RT-PCR. *Intern J Vet Scie.* 2013;2(4):138-142.
8. Mase, M., dan Kanehira, K. Simple Differentiation of Avirulent and Virulent Strains of Avian Paramyxovirus Seerotipe-1 (Newcastle Disease Virus) by PCR and Restriction Endonuclease Analysis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*. 2012;74(12):1661-1664.
9. Kant, A., Koch, G., Roozelaar, D.J.V., Balk, F., Huurne, A.T. Differentiation of Virulent and Non-Virulent Strains of Newcastle Disease Virus within 24 Hours by Polymerase

- Chain Reaction. *Avian Pathology*. 1997;26: 837-849.
10. Fazel, P.D., Khoobyar, S., Mehrabanpour, M.J., Rahimian, A. Isolation and Differentiation of Virulent and Non Virulent Strains of Newcastle Disease Virus by Polymerase Chain Reaction from Commercial Broiler Chicken Flocks in Shiraz-Iran. *Int. J. Anim. Veter. Adv.* 2012;4(6): 389-393.
 11. Qin, Z.M., Tan, L.T., Xu, H.Y., Ma, B.C., Wang, Y.L., Yuan, X.Y., Liu, W.J. Pathotypical Characterization and molecular epidemiologi of Newcastle Disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *J Clin Microbiol.*2008: 601-611.
 12. Kencana, G.A.Y. *Penyakit Virus Unggas*. Bali: Udayana University Press. 2012:34-53.
 13. Office International des Epizooties (OIE). Newcastle Disease. Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccine. 2012:576-589.
 14. Tiwari, A.K., Kataria, R.S., Nanthakumar, T., Dash, B.B., Desai, G. Differential Detection of Newcastle Disease Virus Strains by Degenerate Primers Based RT-PCR. *Comp. Immun. Infect. Dis.* 2004;27: 163-169.
 15. Farkas, T., Szekely,E., Belak, S., Kiss, I. Real-Time PCR-Based Pathotyping of Newcastle Disease Virus by Use of TaqMan Minor Groove Binder Probes. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(7):2114-2123.

**PEMANFAATAN PROBIOTIK BAKTERI
ASAM LAKTAT *Streptococcus thermophilus* DARI LIMBAH
KOTORAN IKAN TERHADAP PERFORMAN PERTUMBUHAN
DAN KADAR KOLESTEROL
DAGING AYAM BROILER *Strain Lohmann***

Astuti¹, Zaenal Bachruddin², Supadmo², Eni Harmayani³

¹FMIPA UNY, ²Fakultas Peternakan UGM, ³Fakultas Teknologi Pertanian UGM

E-mail: ibuastuti99@gmail.com

A B S T R A K

Latar Belakang: Penyakit jantung koroner merupakan penyakit nomor satu di negara maju maupun di sekelompok masyarakat menengah keatas di negara berkembang. Kandungan kolesterol tinggi di dalam bahan makanan adalah salah satu penyebab penyakit jantung koroner. Jika kandungan kolesterol dalam bahan pangan hewani dapat dikurangi, maka formulasi dan penggunaan produk hewani yang bergizi tinggi dalam diet dapat diatasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik isolat BAL *Streptococcus thermophilus* dari limbah ikan terhadap performan pertumbuhan ayam broiler yang meliputi penambahan berat badan, konsumsi pakan dan konversi pakan serta kadar kolesterol daging ayam broiler.

Metode: Materi penelitian ini adalah ayam broiler jantan Strain Lohmann produksi PT Multi Breeder Adirama sebanyak 40 ekor umur 1 hari. Probiotik perlakuan isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) yang digunakan dalam penelitaian ini adalah bakteri *Streptococcus thermophilus* dalam bentuk *freeze drying* yang berasal dari Laboratorium Biokimia Nutrisi, Fakultas Peternakan, UGM. Perlakuan I sebagai control (tanpa BAL) perlakuan II jumlah BAL adalah 10^6 CFU/ml, perlakuan III jumlah BAL adalah 10^7 CFU/ml, perlakuan IV jumlah sel BAL adalah 10^8 CFU/ml. Pencatatan data untuk performan dilakukan setiap minggu meliputi penambahan berat badan dan konsumsi pakan. Pengambilan data untuk kadar kolesterol daging dilakukan pada akhir penelitian. Data yang diambil meliputi: penambahan berat badan, konsumsi pakan dan konversi pakan serta kadar kolesterol daging ayam broiler.

Hasil: perlakuan pemberian bakteri asam laktat *Streptococcus thermophilus* menyebabkan menurunnya kadar kolesterol daging ayam broiler secara signifikan, pemberian probiotik BAL tidak berpengaruh terhadap performan pertumbuhan dan level BAL yang terbaik adalah level 10^8 CFU/ml (R3).

Simpulan: Hasil ini mengindikasikan bahwa pemberian probiotik pada peternakan ayam dapat memberikan sumbangan yang berarti bagi peningkatan kualitas daging.

Kata kunci : Bakteri Asam Laktat, kolesterol, ayam broiler.

PENDAHULUAN

Dewasa ini kesadaran masyarakat terhadap kesehatan semakin meningkat. Seiring dengan bertambahnya Ilmu Pengetahuan dan Teknologi menyebabkan kesadaran untuk menjaga kesehatan semakin meningkat. Biaya berobat yang mahal menyebabkan masyarakat lebih mengutamakan upaya preventif untuk mencegah sakit. Salah satu penyakit yang ditakuti adalah penyakit jantung koroner. Penyakit ini merupakan penyakit nomor satu di negara maju maupun di sekelompok masyarakat menengah keatas di negara berkembang.

Menurut para ahli kesehatan terdapat korelasi positif antara kadar kolesterol dalam darah dengan resiko terkena penyakit jantung koroner. Akumulasi kolesterol pada dinding pembuluh darah dapat menyebabkan penyempitan arteri dan beresiko menyebabkan aterosklerosis. Aterosklerosis inilah yang menyebabkan penyakit jantung koroner.

Pencegahan timbulnya penyakit jantung koroner dapat dilakukan dengan mengurangi konsumsi bahan pangan yang berkolesterol tinggi atau mengkonsumsi bahan pangan dengan kolesterol rendah. Bahan pangan hewani seperti susu, telur, daging dan hasil olahannya umumnya mempunyai kadar kolesterol tinggi. Kandungan kolesterol tinggi di dalam bahan makanan telah dikaitkan oleh konsumen sebagai salah satu penyebab penyakit jantung koroner, oleh karena itu sebagian konsumen cenderung membatasi konsumsi kolesterol antara lain dengan mengkonsumsi produk hewani yang berkolesterol rendah. Jika kandungan kolesterol dalam bahan pangan hewani dapat dikurangi, maka formulasi dan penggunaan produk hewani yang bergizi tinggi dalam diet dapat diatasi.

Kolesterol merupakan sterol utama dalam tubuh manusia.¹ Kolesterol merupakan senyawa hasil metabolisme hewan dan banyak tersimpan pada daging, hati, otak dan telur. Walaupun kolesterol memberikan efek negatif jika dikonsumsi secara berlebihan, kolesterol memiliki peran yang penting bagi tubuh yaitu sebagai prekursor senyawa steroid (kortikosteroid, hormon seks, asam empedu, dan vitamin D), dan komponen struktural pembentuk membran sel serta lapisan eksternal lipoprotein plasma.²

Pola konsumsi terhadap makanan berkolesterol tinggi secara berlebihan dapat berefek negatif pada kesehatan. Tingginya level kolesterol darah merupakan faktor resiko utama penyebab terjadinya aterosklerosis dan mengakibatkan penyakit jantung koroner. Aterosklerosis terjadi karena adanya akumulasi kolesterol pada dinding pembuluh darah arteri, sehingga terjadi penyempitan arteri.

Bahan pangan hewani seperti susu, telur, daging dan hasil olahannya umumnya mempunyai kadar kolesterol tinggi. Konsumsi yang berlebihan pada produk hewani tersebut akan memicu kolesterol darah menjadi tinggi, hal tersebut menimbulkan resiko hiperkolesterolemia yang akhirnya akan menyebabkan aterosklerosis.¹ Salah satu upaya pencegahan timbulnya penyakit jantung koroner dapat dilakukan dengan mengurangi konsumsi bahan pangan yang berkolesterol tinggi, atau penambahan suatu makanan atau pakan tambahan yang mampu menurunkan jumlah kolesterol pakan yang diserap di usus dan peningkatan penggunaan kolesterol tubuh.

Pengaruh bakteri probiotik terhadap penurunan kadar kolesterol diduga karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol dan mendekongjugasi garam empedu.^{3,4} Bakteri asam laktat yang

mempunyai kemampuan spesifik akan efektif apabila dapat bertahan dengan kondisi yang ada dalam saluran pencernaan. Oleh karena itu strain dari Bakteri Asam Laktat tersebut harus tahan terhadap garam empedu dan kondisi pH lambung (pH 1-2) apabila dikonsumsi. Strain BAL yang potensial yang akan dikomersialkan sebagai produk probiotik harus memiliki viabilitas yang tinggi dan stabil selama prosesing. Beberapa proses produksi menggunakan *freeze drying* maupun *spray drying* seringkali menyebabkan terjadinya penurunan viabilitas sel sehingga dapat mempengaruhi produk yang dihasilkan (bio massa sel BAL).

Akhir-akhir pemanfaatan probiotik sebagai upaya dalam peningkatan kesehatan tubuh termasuk di dalamnya penurunan kadar kolesterol telah banyak dilakukan. Probiotik adalah kultur tunggal atau campuran dari mikroorganisme hidup yang apabila diberikan ke manusia atau hewan akan berpengaruh baik, karena dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen yang ada di usus manusia atau hewan.⁵ Banyak peneliti telah membuktikan pentingnya peranan mikroflora atau bakteri saluran pencernaan bagi kesehatan, di antaranya adalah bakteri asam laktat.⁶ Bakteri ini berperan positif dalam menjaga keseimbangan mikroflora usus serta membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, yang dikenal sebagai efek probiotik.

Pemberian probiotik pada ayam akan memberikan dampak positif, yaitu dapat memperbaiki kesehatan atau produktifitas ayam, mengubah komponen dan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan ayam. Pemberian probiotik (probiolac pada taraf 100 mg/kg ransum) dapat memperbaiki produksi telur, berat kerabang dan tebal kerabang telur serta menurunkan kadar kolesterol pada kuning telur.⁷ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa pemberian

susu skim yang difermentasi dengan *Lactobacillus acidophilus* dapat menurunkan level serum kolesterol.⁸

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian isolat BAL dari limbah ikan sebagai probiotik yang diberikan pada ayam broiler melalui air minum dengan cara diminumkan menggunakan spet dengan jumlah 1,5 ml per oral terhadap penampilan ayam yang meliputi pertambahan berat badan, konsumsi pakan dan konversi pakan serta kadar kolesterol daging ayam broiler. Disamping itu dengan adanya penelitian ini diharapkan nantinya akan terwujud suatu usaha peternakan ayam broiler yang lebih sehat karena kandungan kolesterolnya tidak terlalu tinggi. Penelitian ini diharapkan juga dapat bermanfaat untuk perkembangan Ilmu Pengetahuan di bidang peternakan.

METODE PENELITIAN

Pelaksanaan Pemeliharaan

Kandang dan peralatannya sebelum digunakan untuk penelitian terlebih dahulu disucikan dengan menggunakan brochid. Vaksinasi dilakukan 2 kali yaitu vaksinasi ND-1 pada umur 3 hari dan ND-2 pada umur 20 hari. Pakan disusun berdasarkan hasil pertimbangan dari tabel komposisi bahan menurut NRC (1994).⁹ Pakan dan air minum diberikan 2 kali sehari yaitu pada pukul 07.00 dan pukul 15.30 WIB. Probiotik diberikan setiap sore hari melalui air minum dengan cara diminumkan menggunakan spet dengan jumlah 1,5 ml per oral.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 35 hari di kandang ternak unggas Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan

Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta mulai 1 Oktober sampai 15 Oktober 2005. Analisis kadar kolesterol daging dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Rancangan Penelitian

Model rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap pola searah. Ayam broiler sebanyak 40 ekor dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan setiap perlakuan diulang 10 kali setiap ulangan menggunakan 1 ekor ayam.

Data yang Dikumpulkan

Pencatatan data untuk performan dilakukan setiap minggu meliputi penambahan berat badan dan konsumsi pakan. Pengambilan data untuk kadar kolesterol daging dilakukan pada akhir penelitian.

Pertambahan Berat Badan (g/ekor/hari)

Penimbangan berat ayam setiap 1 minggu sekali dari umur 0 minggu sampai umur 5 minggu. Penimbangan dilakukan pada pagi hari sebelum pakan diberikan.

Konsumsi dan Konversi Pakan

Konsumsi pakan harian (g/ekor/hari) diketahui dari selisih antara pakan yang diberikan dengan sisa pakan. Sedangkan konversi pakan diperoleh pembagian jumlah konsumsi pakan setiap hari selama penelitian dengan penambahan berat badan per hari dalam satuan berat dan waktu yang sama.

Persentase Kolesterol Daging.

Persentase kolesterol daging diperoleh dengan metode Lieberman Bunchad.

Pengambilan Daging

Pengambilan daging ayam broiler *strain lohman* perlakuan dilakukan setelah ayam disembelih. Daging ayam yang diambil pada bagian dada, tepatnya di daerah sternum. Daging tubuh inilah terdapat sebagian besar daging ayam broiler, terutama daging dibagian dadanya yang terbaik.¹⁰

Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis varian yaitu *Completely Randomized Design* (CRD). Apabila ada perbedaan diuji dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

Tabel 1. Pengaruh pemberian BAL terhadap konsumsi pakan, penambahan berat badan dan konversi pakan.

	Perlakuan				Significantly
	R-0	R-1	R-2	R-3	
Konsumsi pakan (g/ekor/hari)	91,42 ^{ab}	95,41 ^a	85,31 ^b	86,38 ^{ab}	*
Pertambahan berat badan (g/ekor/hari)	44,07 ^{ab}	47,14 ^a	45,03 ^{ab}	43,28 ^b	*
Konversi pakan	2,10	2,08	2,04	2,01	ns

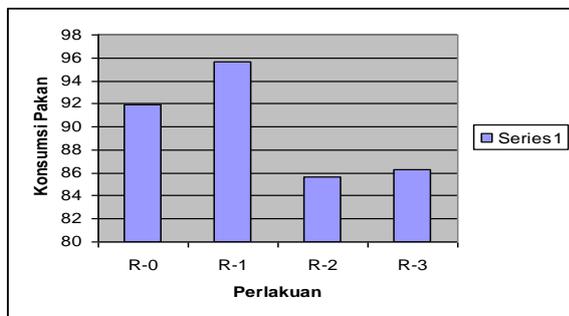
Keterangan kelompok: R-0: Kelompok tanpa pemberian BAL (kontrol); R-1: diberi dosis BAL 10⁶ CFU/ml; R-2: diberi dosis BAL sebesar 10⁷ CFU/ml; R-3: diberi dosis BAL 10⁸ CFU/ml. Keterangan huruf: superskrip berbeda (ab) menunjukkan perbedaan yang nyata (p< 0,05). NS = non significant

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsumsi Pakan

Konsumsi pakan pada ayam broiler yang diberi probiotik BAL berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan konsumsi pakan kontrol (tidak diberi probiotik BAL) seperti tertera pada tabel 1.

Dari tabel 1 dapat dilihat pemberian probiotik BAL berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap konsumsi pakan. Setelah dilakukan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DMRT) ternyata perlakuan R-0 (kontrol) tidak berbeda nyata dengan perlakuan R-1, R-2, R-3, akan tetapi terdapat perbedaan pada perlakuan R1 dengan perlakuan R2 dan R3.



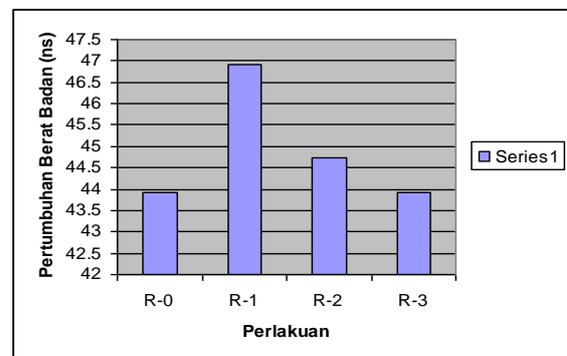
Gambar 1. Grafik Konsumsi pakan

Dari Gambar 1, konsumsi pakan secara kumulatif yang menunjukkan angka tertinggi adalah perlakuan R-1 yaitu sebesar 95, 62 g dan perlakuan yang terendah adalah perlakuan R 2 yaitu sebesar 85, 63 g. Semakin banyak pemberian BAL konsumsi pakan pada ayam menjadi turun. Pemberian probiotik berpengaruh terhadap konsumsi pakan ayam broiler.¹¹ Penurunan konsumsi pakan pada R-2 dan R-3 disebabkan karena BAL melakukan kolonisasi di dalam usus halus sehingga mendesak bakteri patogen keluar dari usus halus, sehingga memudahkan proses absorpsi nutrisi dalam saluran pencernaan, sedang pada R-1 terjadi kenaikan pakan karena bakteri asam laktat pada konsentrasi 10^6 CFU/ml (R-1) dimungkinkan belum mampu bekerja optimal untuk mendesak bakteri

patogen keluar dari saluran pencernaan sehingga konsumsinya lebih tinggi dibandingkan kontrol (R-0). Pemberian probiotik pada ayam petelur dapat memperbaiki produksi telur dan konsumsi pakan.¹²

Pertambahan berat badan

Dari Tabel 1 terdapat perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap pertambahan berat badan. Pertambahan berat badan secara kumulatif yang menunjukkan angka tertinggi adalah perlakuan R-1 (10^6 CFU/ml) yaitu sebesar 46,90. Sedangkan yang paling rendah adalah perlakuan R0 (kontrol) dan perlakuan R-3 (10^8 CFU/ml).



Gambar 2. Grafik Pertambahan berat badan

Berdasarkan data pertumbuhan berat badan terdapat perbedaan secara nyata ($P < 0,05$) dan ayam broiler yang diberi probiotik pertambahan berat badannya meningkat. Hal ini sesuai dengan pendapat Havenwar Terdapat beberapa keuntungan dari penggunaan probiotik pada hewan/ternak adalah dapat memacu pertumbuhan dan memperbaiki konversi ransum.^{12,13} Pemberian probiotik pada ayam broiler dilaporkan dapat memperbaiki pertumbuhan dan konversi pakan dan pemberian probiotik pada ayam broiler sebaiknya dilakukan selama 3 minggu pemeliharaan.¹² Hal ini juga didukung oleh penelitian lain yang menyatakan bahwa probiotik EM4 dapat meningkatkan bobot badan.¹⁴

Semua jenis hewan akan mengalami proses pertumbuhan yang sama, yakni pada awal pertumbuhan mereka begitu sangat cepat. Tetapi proses pertumbuhan berikutnya semakin lama kian menurun, bahkan pada umur tertentu terhenti sama sekali. Kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) pada unggas biasanya diukur melalui penambahan berat badan, dengan menimbang ayam yang telah diteiti berdasarkan satuan waktu tertentu. Pengukuran pertumbuhan ternyata bermacam-macam, namun demikian pada azasnya sama ialah berdasarkan penimbangan berat badan.

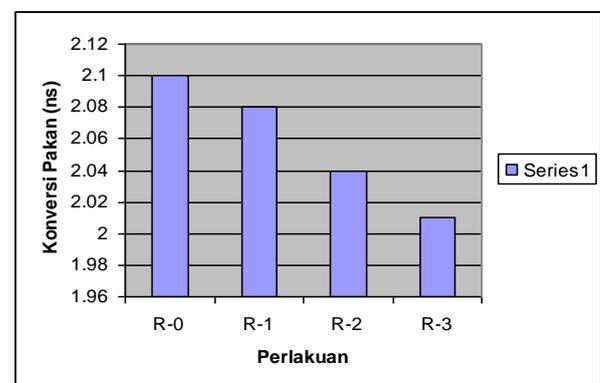
Setelah diberi perlakuan, tampak bahwa ayam yang diberikan perlakuan memiliki berat badan yang lebih besar daripada ayam yang tidak diberikan perlakuan. Hal ini dapat dikatakan bahwa probiotik dapat meningkatkan berat badan ayam. Saluran pencernaan baik pada manusia maupun pada hewan terdiri dari bermacam-macam jenis bakteri. Keberadaan bakteri ini disebabkan karena adanya interaksi bakteri dari lingkungan sekitarnya yang mengkontaminasi tubuh ayam melalui pakan. Dilingkungan yang normal, saluran usus pada anak ayam terkolonisasi dengan mikroorganisme. Umumnya sumber mikroflora usus adalah dari permukaan telur yang tidak steril sebagai hasil kontak induk dengan sangkarnya.¹⁵ BAL yang ada pada saluran pencernaan merupakan mikrobial yang paling dominan. Keseimbangan ini akan bergeser apabila hewan tersebut mengalami kondisi stress seperti temperatur dan kelembaban yang tinggi, perubahan pakan, karena transportasi dan lain-lain. Pemberian probiotik secara teratur dan terus menerus terbukti dapat mempertahankan keseimbangan mikroflora alami yang ada pada saluran pencernaan melalui dua cara yaitu dengan cara kompetisi dan dengan cara aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen. Mikroflora alami pada saluran pencernaan

memiliki peranan yang penting dalam proses pencernaan dan penyerapan pakan. Mikroflora ini berperan dalam metabolisme nutrient seperti karbohidrat, protein, lipida dan mineral, juga dalam sintesa vitamin.

Berbagai macam bakteri patogen dapat menyebabkan penyakit pada ayam, diantaranya dari famili *Enterobacteriaceae* antara lain adalah *Salmonella* dan *Escherichia coli*. Bakteri patogen ini dapat menyebabkan penyakit diare dan pullorum yang banyak ditemukan di industri perunggasan di Indonesia. selain kedua bakteri tersebut masih banyak bakteri patogen lain yang menjadi penyebab penyakit pada ayam dan menyebabkan terganggunya pertumbuhan ayam.

Konversi Pakan

Konversi pakan diperlukan untuk menggambarkan sejauh mana efektivitas biologis pemanfaatan zat gizi dalam pakan. Semakin rendah nilai konversi pakan, semakin tinggi tingkat efisiensi penggunaan pakannya. Dari hasil penelitian tidak ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) diantara perlakuan. Konversi pakan diberi probiotik BAL pada perlakuan pakan semakin menurun dibandingkan dengan kontrol yaitu tanpa pemberian probiotik. Hasil dari konversi pakan dapat dilihat pula pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik Konversi Pakan

Konversi pakan ayam yang diberi probiotik BAL lebih rendah dari kontrol. Ini merupakan indikasi bahwa pemberian probiotik pada peternakan ayam dapat memberikan sumbangan yang berarti bagi peningkatan kualitas, karena perlakuan yang diberi tambahan probiotik konversi pakannya menurun. Konversi pakan pada perlakuan pemberian probiotik lebih rendah dari kontrol menunjukkan bahwa semakin kecil jumlah pakan yang dibutuhkan akan menghasilkan pertambahan berat badan ayam yang berarti.

Hal ini sesuai dengan penelitian selanjutnya yaitu beberapa keuntungan dari

penggunaan probiotik pada hewan ternak antara lain dapat memacu pertumbuhan, memperbaiki konversi ransum.^{12,13} Pemberian probiotik pada ayam brolier dilaporkan dapat memperbaiki pertumbuhan dan angka konversi pakan.

Kadar Kolesterol Daging

Setelah 35 hari seluruh ayam dipotong untuk diambil dagingnya.. Daging ayam yang diambil adalah pada bagian dada. Hasil analisis statistik diketahui pengaruh pemberian probiotik BAL terhadap kandungan kolesterol daging dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kadar Kolesterol

	Perlakuan				Signifikanly
	R-0	R-1	R-2	R-3	
Kadar kolesterol daging (mg/100 g)	173,8 ^b	153,5 ^{ab}	143,02 ^{ab}	127,9 ^a	*

^{ab} superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

^{ns} non significant

R0 : Kelompok tanpa pemberian bakteri asam laktat (sebagai kontrol)

R1 : Kelompok yang diberi dosis bakteri asam laktat sebesar 10⁶ CFU/ml

R2 : Kelompok yang diberi dosis bakteri asam laktat sebesar 10⁷ CFU/ml

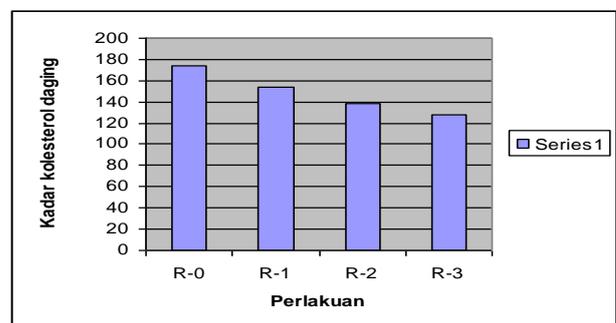
R3 : Kelompok yang diberi dosis bakteri asam laktat sebesar 10⁸ CFU/ml

Kadar Kolesterol Daging

Dapat dilihat bahwa kadar kolesterol daging ayam broiler hasilnya berbeda nyata (P < 0,05). Kadar kolesterol pada R-1, R-2, R-3 turun secara signifikan (P < 0,05) jika dibandingkan dengan kontrol.

Berdasarkan Gambar 4, penurunan kadar kolesterol daging tertinggi yaitu perlakuan R-3, yaitu pemberian BAL 10⁸ CFU/ml yaitu sebesar 127,9 diikuti perlakuan R-2 pemberian BAL 10⁷ CFU/ml sebesar 143,02 kemudian baru perlakuan R-1 pemberian BAL 10⁶ CFU sebesar 153,5. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu penelitian mengenai efek hipokolesterolemik yogurt yang disuplemenisasi probiotik *Indigenous* pada

tikus hasilnya bisa menurunkan kadar kolesterol darah sampai 36,14%.¹⁶



Gambar 4. Grafik Kadar Kolesterol Daging

Berdasarkan Gambar 4, penurunan kadar kolesterol daging tertinggi yaitu perlakuan R-3, yaitu pemberian BAL 10⁸ CFU/ml yaitu

sebesar 127,9 diikuti perlakuan R-2 pemberian BAL 10^7 CFU/ml sebesar 143,02 kemudian baru perlakuan R-1 pemberian BAL 10^6 CFU sebesar 153,5. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu penelitian mengenai efek hipokolesterolemik yogurt yang disuplementasi probiotik *Indigenous* pada tikus hasilnya bisa menurunkan kadar kolesterol darah sampai 36,14%.¹⁶

Beberapa peneliti mengusulkan mekanisme penurunan kolesterol oleh bakteri probiotik, diantaranya: asimilasi kolesterol, dekonjugasi asam empedu. Penurunan kolesterol oleh biomassa sel *S. thermophilus* pada penelitian ini diduga secara tidak langsung karena terjadinya dekonjugasi garam empedu.

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa kadar kolesterol daging ayam broiler hasilnya berbeda nyata ($P < 0,05$). Kadar kolesterol pada R-1, R-2, R-3 turun secara signifikan ($P < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol. Penurunan kadar kolesterol daging tertinggi yaitu perlakuan R-3, yaitu pemberian asam laktat 10^8 CFU/ml yaitu sebesar 127,9 diikuti perlakuan R-2 pemberian asam laktat 10^7 CFU/ml sebesar 143,02 kemudian baru perlakuan R-1 pemberian asam laktat 10^6 CFU sebesar 153,5. Beberapa peneliti mengusulkan mekanisme penurunan kolesterol oleh bakteri probiotik, diantaranya: asimilasi kolesterol, dekonjugasi asam empedu. Penurunan kolesterol oleh biomassa sel *S. thermophilus* pada penelitian ini diduga secara tidak langsung karena terjadinya dekonjugasi garam empedu. Pada mekanisme secara tidak langsung, empedu yang sampai ke ileum dan cecum akan didekonjugasi oleh *S. thermophilus* dan membentuk asam empedu primer. Dekonjugasi terjadi karena adanya enzim *bile salt hidrolase* yang dihasilkan bakteri ini. Asam empedu primer akan mengalami dehidroksilasi menjadi asam

empedu sekunder dan dikeluarkan bersama feses. Semakin tinggi aktivitas enzim *bile salt hidrolase* dalam mendekongugasi asam empedu, semakin banyak asam empedu yang akan dikeluarkan. Tubuh akan membentuk asam empedu baru untuk menggantikan asam empedu yang dikeluarkan. Pembentukan asam empedu baru ini membutuhkan kolesterol sebagai prekursor sehingga level kolesterol serum akan menurun.

Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Rodas dkk pada babi hiperkolesterol.¹⁷ Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pemberian *Lactobacillus acidophilus* dapat menurunkan kolesterol serum lebih besar dibanding tanpa pemberian bakteri ini. Pemberian *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 pada tikus hiperkolesterol dapat menurunkan kolesterol serum sebesar 38%. Penemuan ini kemungkinan disebabkan dekonjugasi asam empedu.¹⁸ Adanya penurunan kolesterol serum pada tikus yang diberi susu yang disuplementasikan dengan *Lactobacillus gasseri* SBT 0270 (non fermentasi) karena terjadinya dekonjugasi garam empedu.¹⁹

Hasil penelitian terhadap ayam yang diberi probiotik *S. thermophilus* sebesar 10^8 CFU/ml menunjukkan kadar kolesterol daging dan kadar kolesterol darah paling rendah dibandingkan dengan R-0, dan R-1, R-2. Hal ini diduga karena adanya jumlah sel yang lebih banyak pada kelompok ini (10^8 cfu/ml). Semakin banyak asupan sel probiotik, semakin banyak pula sel yang dapat bertahan melewati saluran pencernaan sampai ke usus besar sehingga level kolesterol daging.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian bakteri asam laktat dapat menurunkan kadar kolesterol darah ayam broiler. Hal ini dapat terjadi karena bakteri asam laktat mempunyai kemampuan untuk melakukan dekonjugasi garam empedu.

Pada mekanisme dekonjugasi garam empedu, penurunan kolesterol terjadi secara tidak langsung dan terjadi selama siklus enterohepatik. Pada mekanisme ini diterangkan bahwa kolesterol merupakan komponen penyusun asam empedu sehingga katabolisme dan pengeluaran asam empedu bersama feses akan berakibat pada penurunan kadar kolesterol.

Asam empedu utama yang disintesis dari kolesterol di hati adalah asam kolat dan asam kenodeoksikolat. Kedua asam empedu tersebut dapat berkonjugasi dan dapat pula mengalami dekonjugasi. Asam empedu primer ini berkonjugasi dengan glisin dan taurin serta disimpan dalam bentuk asam empedu terkonjugasi di dalam empedu untuk disekresi bertahap pada saluran pencernaan. Asam empedu terkonjugasi disekresikan ke dalam usus halus untuk membantu absorpsi lemak, kolesterol, dan vitamin larut lemak. Dalam ileum dan caecum, asam empedu terkonjugasi akan didekonjugasi oleh bakteri membentuk lithokolat dan deoksikolat. Sebanyak $\pm 97\%$ asam empedu terkonjugasi diabsorpsi dari usus halus dan dikembalikan ke hati oleh sirkulasi portal hepatic. Sejumlah kecil garam empedu (250-400 mg) yang tidak diabsorpsi dalam proses ini akan hilang dan keluar bersama feses sebagai asam empedu bebas. Sifat asam empedu bebas di antaranya kurang larut dan kurang dapat diabsorpsi oleh lumen usus dibanding asam empedu terkonjugasi.

Dekonjugasi asam empedu dapat memacu penurunan kadar kolesterol daging dengan menaikkan pembentukan asam empedu baru yang dibutuhkan untuk mengganti yang hilang selama sirkulasi enterohepatik, dimana pembentukannya memerlukan kolesterol sebagai prekursor. Dengan demikian siklus ini akan berlangsung terus, sehingga katabolisme kolesterol

semakin cepat dan akhirnya dapat mengurangi penumpukan kolesterol.

Pada penelitian ini terlihat bahwa perlakuan pemberian bakteri asam laktat 10^7 cfu/ml (R2) dan pemberian bakteri asam laktat 10^8 cfu/ml (R3) mampu menurunkan kolesterol secara nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena jumlah sel yang diberikan pada perlakuan R2 dan R3 lebih banyak yaitu 10^7 cfu/ml dan 10^8 cfu/ml dibanding perlakuan R1 yang hanya 10^6 cfu/ml. Jumlah sel yang lebih banyak sangat menentukan terjadinya penurunan kolesterol. Dapat dikatakan bahwa pada penelitian ini yang paling efektif untuk menurunkan kolesterol adalah pada perlakuan R3 yaitu dengan jumlah sel yang paling banyak 10^8 cfu/ml. Semakin banyak intake sel probiotik, maka semakin banyak pula yang dapat bertahan melewati saluran pencernaan dan sampai di usus besar karena di usus besar inilah terjadi proses dekonjugasi garam empedu.

Kemampuan bakteri asam laktat untuk melakukan dekonjugasi garam empedu menunjukkan bahwa bakteri yang diteliti berpotensi sebagai probiotik yang dapat menurunkan kadar kolesterol. Seperti yang dijelaskan oleh penelitian terdahulu bahwa kemampuan untuk melakukan dekonjugasi garam empedu merupakan mekanisme utama penurunan kadar kolesterol. Penurunan kadar kolesterol yang terjadi akibat dari dekonjugasi garam empedu ini terjadi di saluran pencernaan dan di dalam tubuh ayam.²⁰

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian bakteri asam laktat dapat menurunkan kadar kolesterol daging ayam broiler. Hal ini dapat terjadi karena bakteri asam laktat mempunyai kemampuan asimilasi kolesterol dan mendekonstruksi garam empedu. Kedua fenomena inilah yang menjadikan bakteri asam laktat mampu menurunkan kadar kolesterol daging.

Pada mekanisme asimilasi kolesterol, proses ini terjadi secara langsung. Pada proses ini terjadi pengikatan kolesterol oleh bakteri, sehingga sejumlah kolesterol tidak akan tersedia di usus untuk di absorpsi ke dalam darah. Sebagian kolesterol yang terasimilasi bergabung dengan membran sel bakteri.²¹ Asimilasi kolesterol ke dalam membran sel meningkatkan ketahanan sel terhadap lisis. Asimilasi kolesterol oleh bakteri menyebabkan kolesterol tidak dapat diserap oleh tubuh sehingga akan dikeluarkan bersama feses.

Sementara itu pada mekanisme dekonjugasi garam empedu, penurunan kolesterol terjadi secara tidak langsung dan terjadi selama siklus enterohepatik. Pada mekanisme ini diterangkan bahwa kolesterol merupakan komponen penyusun asam empedu sehingga katabolisme dan pengeluaran asam empedu bersama feses akan berakibat pada penurunan kadar kolesterol. Asam empedu utama yang disintesis dari kolesterol di hati adalah asam kholat dan asam kenodeoksikolat. Kedua asam empedu tersebut dapat berkonjugasi dan dapat pula mengalami dekonjugasi. Asam empedu primer ini berkonjugasi dengan glisin dan taurin dan disimpan dalam bentuk asam empedu terkonjugasi di dalam empedu untuk disekresi bertahap pada saluran pencernaan. Asam empedu terkonjugasi disekresikan ke dalam usus halus untuk membantu absorpsi lemak, kolesterol dan vitamin larut lemak. Dalam ileum dan caecum, asam empedu terkonjugasi akan di dekonjugasi oleh bakteri membentuk lithokolat dan deoksikolat. Sebanyak $\pm 97\%$ asam empedu terkonjugasi di absorpsi dari usus halus dan di kembalikan ke hati oleh sirkulasi portal hepatic. Sejumlah kecil garam empedu (250-400 mg) yang tidak diabsorpsi dalam proses ini akan hilang dan keluar bersama feses sebagai asam empedu bebas. Sifat asam empedu bebas diantaranya kurang

larut dan kurang dapat diabsorpsi oleh lumen usus dibanding asam empedu terkonjugasi. Dekonjugasi asam empedu dapat memacu penurunan serum kolesterol dengan menaikkan pembentukan asam empedu yang baru yang dibutuhkan untuk mengganti yang hilang selama sirkulasi enterohepatik, dimana pembentukannya memerlukan kolesterol sebagai prekursor. Dengan demikian siklus ini akan berlangsung terus, sehingga katabolisme kolesterol semakin cepat dan akhirnya dapat mengurangi penumpukan kolesterol.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian probiotik bakteri asam laktat dari limbah ikan pada ayam broiler dapat menurunkan konsumsi pakan, konversi pakan dan dapat meningkatkan penambahan berat badan yaitu pada perlakuan R-1 yaitu pemberian BAL 10^6 CFU/ml. Pemberian probiotik bakteri asam laktat juga dapat menurunkan kadar kolesterol daging yaitu pada perlakuan R-3 dengan dosis Bal 10^8 CFU/ml.

DAFTAR PUSTAKA

1. Montgomery, R., R.L. Dryer, T.W. Conway and A.A. Spector. 1993. Biokimia. Jilid I. Edisi IV (Terjemahan: M. Ismadi dan S. Dawiesah). Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
2. Mayes, PA. 1999. Sintesis pengangkutan dan ekskresi kolesterol. Dalam Murray, RK, DK. Granner, PA. Mayes, dan VW. Rodwell. *Tras. Andry Hartono., Biokimia Harper.* ed. 24: 277. EGC. Jakarta: EGC
3. Gilliland, S.E., T.E and M.L. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbial.* 49: 377-381.
4. Gilliland, S.E. and C.R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbial.* 49 : 377 – 381.

5. Mulyorini, R. 2006. Probiotik dalam <http://www.republika.co.id>. Diakses tanggal 13 Januari 2006
6. Inggrid S. 2001. "Efek Probiotik, Prebiotik dan Synbiotik Bagi Kesehatan" dalam Kompas edisi 30 September 2001.
7. Panda, A.K., M.R. Reddy, S.V. Rama Rao and N.K. Praharaj, 2003. Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic. Trop. Anim. Health and Prod. 35: 85-94.
8. Grunewald, K.K. 1982 Serum Cholesterol levels in rats fed skim milk fermented Byobacillus acidophilus. J of Food Sci, 47 : 2078-2079
9. NRC. 1994. Nutrient Requirement of Poultry. National Academy Press. Washington.
10. Rasyaf, M. 1994. Beternak Ayam Pedaging. Penebar Swadaya, Jakarta.
11. Safalaoh, A.C.L. 2006. Body weight gain, Dressing percentage, abdominal fat and serum cholesterol of broilers supplemented with a microbial preparation. Department of animal science. University of Malawi.
12. Kim, S.H., S.Y. Park, D.J. Yu, S.J. Lee, K.S. Ryu and D.G. Lee. 2003. Effects of Feeding Aspergillus oryzae ferments on Performance, Intestinal Microflora, Blood Serum Components and Environmental factors In Broiler. Kor. J. Poult. Sci. , 30:151-159.
13. Havenaar, R. and J.H.J. Huis in 'Veld. 1992. Probiotic: A general View, In : B. J. B. Wood (ed) The Lactic Acid Bacteria. Elsevier Applied Science. London.
14. Soeharsono, H., 2002. Probiotik. Alternatif Pengganti Antibiotik dalam Bidang Peternakan. Labolaturium Fisiologi dan Biokimia. Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran.
15. Hakim, Roli Sofwah. 2010. Prospek Probiotik pada Broiler. Diambil dari situs <https://tonikomara.wordpress.com/2010/04/27/prospek-probiotik-pada-broiler/>
16. Lestari, Lily Arsanti. 2003. Efek hipokolesterolemik yoghurt yang disuplementasi probiotik indigenous pada tikus Sprague dowley. Tesis. Yogyakarta: FK UGM, Unpublished.
17. Rodas, BZ, S.E Gilliland and C.V. Maxwell. 1996. Hypocholesterolemic action Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diets. J.Dairy Sci. 79:2121-2128
18. Taranto, M.P., M. Medici, G. Perdigon, A.P. Ruiz Holdago and G.F. Valdez. 1998. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J. Dairy Sci. 81 : 2336-2340.
19. Usman and A. Hosono. 2000. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. J. Dairy Sci. 83, 1705 - 1711.
20. Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki, and I. Mierau. 1999. *Screening Of Lactic Acid Bacteria For Bile Salt Hydrolase Activity*. J. Dairy Sci. 82:2530-2535 dalam <http://jds.fass.org/cgi/reprint/82/12/2530>. Diakses tanggal 21 Agustus 2006 jam 13.01
21. Buck, M.L. and S.E. Gilliland. 1994. Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77 : 2929-2933.

PENENTUAN *PROTEIN EFFICIENCY RATIO (PER)* TEPUNG KORO PEDANG PUTIH (*Canavalia ensiformis L.*) PADA TIKUS *SPRAGUE-DAWLEY* JANTAN LEPAS SAPIH

Agnes-Murdiati¹, Citra Bonita Permatasari¹, dan Sri Anggrahini¹

¹Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

E-mail: amurdiati@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Koro pedang putih mulai banyak dibudidayakan di Indonesia karena kandungan proteinnya cukup tinggi, koro pedang putih ini sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas protein koro pedang putih berdasar nilai *Protein Efficiency Ratio (PER)*.

Metode: Penelitian ini menggunakan 18 tikus *Sprague-Dawley* jantan lepas sapih yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu satu kelompok diberi pakan standar AIN 93-G, satu kelompok diberi pakan tepung koro pedang putih mentah, dan satu kelompok diberi pakan tepung koro pedang putih perlakuan *water blanching* dan perendaman. Intervensi pakan dilakukan selama 28 hari. Asupan pakan dihitung setiap hari, sedangkan berat badan diamati setiap 3 hari.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai PER pakan standar sebesar 2,35 namun nilai PER tepung koro pedang putih perlakuan *water blanching* dan perendaman sangat rendah yaitu sebesar 0,34 sedangkan nilai PER tepung koro pedang putih mentah hanya sebesar -0,01.

Simpulan: Hal ini menunjukkan bahwa protein koro pedang putih tidak dapat diandalkan sebagai pangan sumber protein tunggal namun harus dikonsumsi bersama-sama dengan sumber protein lain untuk meningkatkan kualitas proteinnya.

Kata kunci: Koro Pedang Putih, *Protein Efficiency Ratio (PER)*

PENDAHULUAN

Koro Pedang Putih merupakan salah satu jenis koro-koroan yang dapat tumbuh di berbagai jenis tanah dan mudah dibudidayakan. Koro Pedang Putih memiliki produktivitas yang tinggi yaitu 5-7 ton/ha, lebih tinggi daripada koro jenis lain misalnya koro bengkok (*Mucuna puriens L.*) dengan produktivitas 3-4 ton/ha dan juga lebih tinggi dari kedelai yang hanya 1-2 ton/ha.¹ Kandungan protein Koro Pedang Putih sangat tinggi yaitu 22,8–35,3%.² Kandungan protein yang tinggi membuat Koro Pedang Putih

banyak dimanfaatkan sebagai bahan dasar berbagai produk makanan olahan seperti kue kering, brownies, tempe, kerupuk, keripik, dan susu koro pedang.³ Meskipun telah diketahui bahwa Koro Pedang Putih memiliki kandungan protein yang cukup tinggi namun besarnya kandungan protein tersebut tidak mencerminkan kualitas proteinnya sehingga perlu dilakukan pengujian mengenai kualitas protein Koro Pedang Putih. Salah satu cara penentuan kualitas protein adalah dengan menentukan nilai PER (*Protein Efficiency Ratio*)–nya. Sebelumnya telah ada publikasi mengenai kualitas protein Koro Pedang Putih

ditinjau dari nilai *Net Protein Utilization* (NPU). Menurut Agbede dan Aletor (2005) nilai NPU tepung Koro Pedang Putih adalah 25,3–27,2%. Namun, nilai NPU tidak dapat menunjukkan pengaruh konsumsi protein tepung Koro Pedang Putih terhadap pertumbuhan, sehingga perlu dilakukan uji kualitas protein dengan penentuan nilai efisiensi protein (*Protein Efficiency Ratio*).

Pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan tepung Koro Pedang Putih dengan perlakuan pendahuluan *blanching* selama 10 menit dan perendaman selama 48 jam dan dilanjutkan dengan uji *Protein Efficiency Ratio* (PER) untuk mengetahui pengaruh konsumsi tepung Koro Pedang Putih (*Canavalia ensiformis* L.) terhadap pertumbuhan hewan percobaan.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kualitas protein tepung Koro Pedang Putih, baik tepung Koro Pedang Putih mentah maupun tepung Koro Pedang Putih dengan perlakuan *blanching* dan perendaman, ditinjau dari nilai *Protein Efficiency Ratio* (PER).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara adalah Koro Pedang Putih diperoleh dari Kelompok Tani Tulsid (Tulakan, Sidowayah), Desa Selopura, Kecamatan Batuwarno, Kabupaten Wonogiri, Propinsi Jawa Tengah, tikus *Sprague-Dawley* lepas sapih dari LPPT-UGM, dan bahan-bahan kimia p.a. dan bahan pakan diperoleh dari supplier.

Cara Penelitian

Terdiri dari 4 tahap yaitu penyiapan tepung Koro Pedang Putih mentah dan tepung Koro Pedang Putih perlakuan blansing dan perendaman, penyiapan pakan tikus percobaan, intervensi dengan pemberian pakan tikus mengandung tepung Koro Pedang Putih, dan perhitungan nilai PER.

a. Penyiapan Tepung Koro Pedang

Tepung Koro Pedang Putih mentah dipersiapkan melalui pengupasan kulit biji Koro Pedang Putih dilanjutkan dengan pengeringan pada pengering kabinet suhu 55°C selama 24 jam, dan penggilingan serta pengayakan 40 mesh. Sedangkan tepung Koro Pedang Putih perlakuan blansing dan perendaman dipersiapkan dengan blansing biji Koro Pedang Putih selama 10 menit, dilanjutkan dengan perendaman selama 12 jam diikuti dengan pengupasan. Biji Koro Pedang Putih yang sudah terkupas selanjutnya diperlakukan direndam selama 3 x 12 jam, dikeringkan dalam pengering kabinet suhu 55°C selama 48 jam, digiling dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Analisis dilakukan terhadap komposisi zat gizi meliputi kadar air metode thermogravimetri, lemak metode soxhlet, protein metode mikro kjeldahl, abu metode gravimetri, dan karbohidrat by difference.⁴

b. Penyiapan Pakan Tikus Percobaan

Komposisi pakan tikus mengacu pada AIN 93G dengan mengganti protein pakan tikus menggunakan protein tepung Koro Pedang Putih mentah dan tepung Koro Pedang Putih perlakuan blansing dan perendaman.⁵ Komposisi pakan tikus disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pakan Tikus Percobaan

Bahan	Pakan standar	Pakan mengandung Koro Pedang Putih perlakuan	Pakan mengandung Koro Pedang Putih mentah
Pati jagung (maizena)	39,75	0,00	11,73
Kasein	20,00	0,00	0,00
Maltodekstrin	13,20	0,00	0,00
Sukrosa	10,00	0,00	0,00
Minyak kedelai	7,00	3,60	2,97
Selulosa	5,00	4,65	5,00
Campuran mineral	3,50	3,50	3,50
Campuran vitamin	1,00	1,00	1,00
L-cystine	0,30	0,30	0,30
Kolin bitartrat	0,25	0,25	0,25
Tepung koro pedang	0,00	86,70	75,25
Jumlah	100,00	100,00	100,00

c. Intervensi Dengan Pemberian Pakan Tikus Mengandung Tepung Koro Pedang Putih.⁶

Penelitian ini sudah mendapatkan *etical clearance* dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan No. Ref.: KE/FK/835/EC.

Tikus Sprague-Dawley jantan lepas saphi sebanyak 18 ekor diadaptasi selama 3 hari, kemudian ditimbang dan dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok I diberi pakan standar, kelompok II diberi pakan mengandung tepung Koro Pedang Putih mentah, dan kelompok III diberi pakan mengandung tepung Koro Pedang Putih perlakuan blansing dan

perendaman. Periode intervensi dilakukan selama 28 hari dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Banyaknya pakan yang dikonsumsi dicatat setiap hari dengan menghitung jumlah pakan yang disediakan dikurangi jumlah pakan yang tersisa. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap 3 hari sekali.

d. Penentuan Nilai PER

Nilai *Protein efficiency ratio* (PER) merupakan perbandingan antara kenaikan berat badan hewan percobaan terhadap banyaknya protein yang dikonsumsi. Nilai PER dihitung dengan rumus dibawah ini.⁶

$$PER = \frac{\text{kenaikan berat badan hewan coba (g)}}{\text{jumlah protein yang dikonsumsi (g)}}$$

Jika koreksi terhadap kasein = 2,5 maka PER terkoreksi dihitung dengan rumus:

$$PER \text{ terkoreksi} = PER \text{ protein yang diuji} \times \frac{2,5}{PER \text{ protein kasein}}$$

Keterangan: 2,5 adalah nilai standar protein kasein.⁶

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Zat Gizi Tepung Koro Pedang Mentah dan Perlakuan

Pada penelitian ini perlu dilakukan analisis untuk mengetahui komposisi zat gizi yang terdapat pada tepung Koro Pedang Putih mentah dan tepung Koro Pedang Putih

perlakuan blansing dan perendaman. Data yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan komposisi pakan perlakuan yang mengandung Koro Pedang Putih mentah dan Koro Pedang Putih perlakuan blansing dan perendaman. Komposisi zat gizi tepung koro pedang mentah dan perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan zat gizi tepung Koro Pedang Putih

Komponen	Tepung Koro Pedang Putih perlakuan	Tepung Koro Pedang Putih mentah
Air (% wb)	7,00	9,25
Protein (%db)	23,07 ^b	26,96 ^a
Lemak (%db)	3,92 ^a	4,00 ^a
Abu (%db)	0,98 ^a	3,23 ^b
Karbohidrat by diference (%db)	72,03 ^b	65,81 ^a

Keterangan: Huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata dengan tingkat signifikansi $\leq 0,05$.

Hasil penelitian kandungan protein tepung Koro Pedang Putih yaitu sebesar 23,07–26,96%. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa kandungan protein pada koro pedang 24% dan kandungan karbohidratnya sebesar 55%.⁷ Pada penelitian lain menunjukkan kandungan protein Koro Pedang Putih berkisar antara 22,8–35,5%.²

Perlakuan blansing dan perendaman mengakibatkan penurunan kandungan protein dari 26,96% pada tepung koro pedang mentah menjadi 23,07% pada tepung koro pedang perlakuan. Hal ini kemungkinan disebabkan selama blansing dan perendaman terjadi proses *leaching* atau penghanyutan dari protein koro pedang. Perlakuan pendahuluan berupa pencucian dan perendaman dalam pembuatan tepung dapat menyebabkan penurunan kandungan protein.⁸ Penurunan kandungan protein koro pedang juga dapat terjadi selama blansing karena terjadinya ekstraksi protein terlarut.⁹

Demikian pula Pujola (2007) menyebutkan bahwa perlakuan perendaman dan pemanasan dapat menurunkan kadar padatan terlarut sebanyak 16,21–21,9% pada berbagai legum.¹⁰ Selama perendaman biji koro pedang terjadi perubahan warna air perendam dari jernih menjadi keruh. Kekeruhan air perendaman berbanding lurus dengan peningkatan kandungan padatan terlarut pada air perendam.¹¹

Kadar lemak tepung koro pedang mentah tidak berbeda dengan tepung koro pedang perlakuan. Lemak merupakan senyawa yang tidak larut air, sehingga perlakuan blansing selama 10 menit dan perendaman selama 48 jam tidak mengakibatkan perbedaan kadar lemak. Hasil pengujian kadar lemak (3,92–4,00%) sesuai dengan hasil penelitian lain yang menyebutkan bahwa kadar lemak Koro Pedang Putih berkisar antara 1,60–12,1%.²

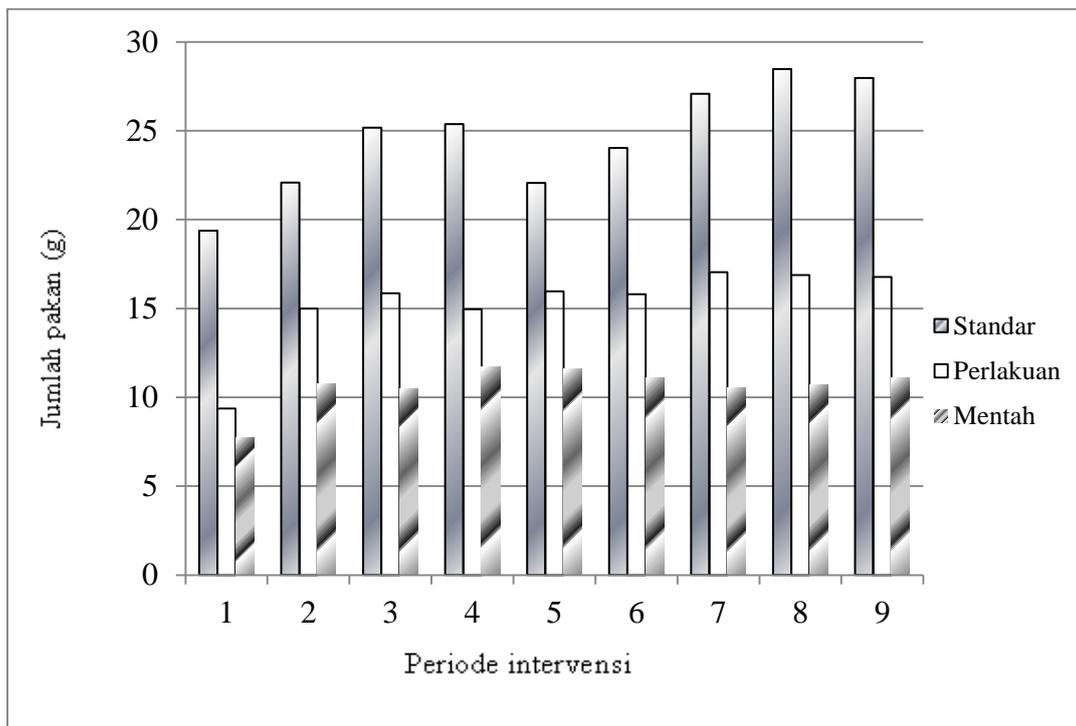
Berdasarkan hasil uji kadar abu, didapatkan hasil kadar abu tepung koro pedang mentah dan tepung koro pedang perlakuan secara berurutan adalah 3,23 dan 0,98%. Menurut Sridhar dan Seena (2006) kadar abu Koro Pedang Putih berkisar antara 2,30–5,80%.² Perlakuan pendahuluan berupa perendaman dan *blanching* pada pembuatan tepung dapat menurunkan kadar mineral secara signifikan.¹² Penurunan kadar mineral pada saat *pre-treatment* perendaman dan *blanching* dapat disebabkan oleh *leaching* beberapa senyawa gizi ke dalam air perendaman.¹³

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa kadar karbohidrat pada tepung koro pedang mentah adalah 65,81% sedangkan pada tepung koro pedang perlakuan adalah

72,03%. Menurut Sridhar dan Seena (2006) kadar karbohidrat pada Koro Pedang Putih berkisar antara 45,8–65,4%.² Pada penelitian ini, kadar karbohidrat ditentukan dengan perhitungan *by-difference*, sehingga penurunan kadar protein dan kadar abu tepung koro pedang perlakuan, mengakibatkan peningkatan kadar karbohidrat tepung koro pedang perlakuan.

Konsumsi Pakan

Pada penelitian ini, intervensi dilakukan selama 28 hari dengan pemberian pakan secara *ad libitum*. Jumlah pakan yang dikonsumsi diakumulasi setiap tiga hari. Hasil akumulasi pakan dalam tiga hari disebut jumlah konsumsi pakan dalam satu periode, yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Konsumsi pakan tikus selama periode intervensi

Berdasarkan pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa kelompok tikus yang diberi pakan standar mengkonsumsi pakan yang paling banyak, kemudian diikuti kelompok

tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang perlakuan dan selanjutnya kelompok tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang mentah

mengonsumsi pakan paling sedikit. Perbedaan jumlah pakan yang di konsumsi oleh ketiga kelompok tikus tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan palatabilitas diantara ketiga jenis pakan yang diberikan.

Pakan kontrol AIN-93G memiliki aroma normal khas kasein dan disukai tikus, sedangkan pakan tepung perlakuan dan tepung mentah memiliki bau languyang disebabkan oleh adanya aktivitas enzim lipoksigenase pada biji koro pedang. Tepung koro pedang mentah memiliki bau langu yang lebih kuat dibanding tepung koro pedang perlakuan. Hal ini yang mungkin menjadi penyebab rendahnya asupan pakan yang dikonsumsi.

Enzim lipoksigenase merupakan sebuah kelompok dioksigenase yang mengandung zat besi non-heme. Lipoksigenase mengkatalisa oksidasi asam lemak tak jenuh rantai panjang dan membentuk hidroperoksida. Hidroperoksida yang terbentuk akan terlibat pada reaksi enzimatik lebih jauh yang secara spontan atau enzimatik akan mengakibatkan pemutusan rantai asam lemak. Pada saat hal ini terjadi, aldehid (heksanal, nonanal) dan keton akan dilepaskan dan menyebabkan aroma langu.¹⁴

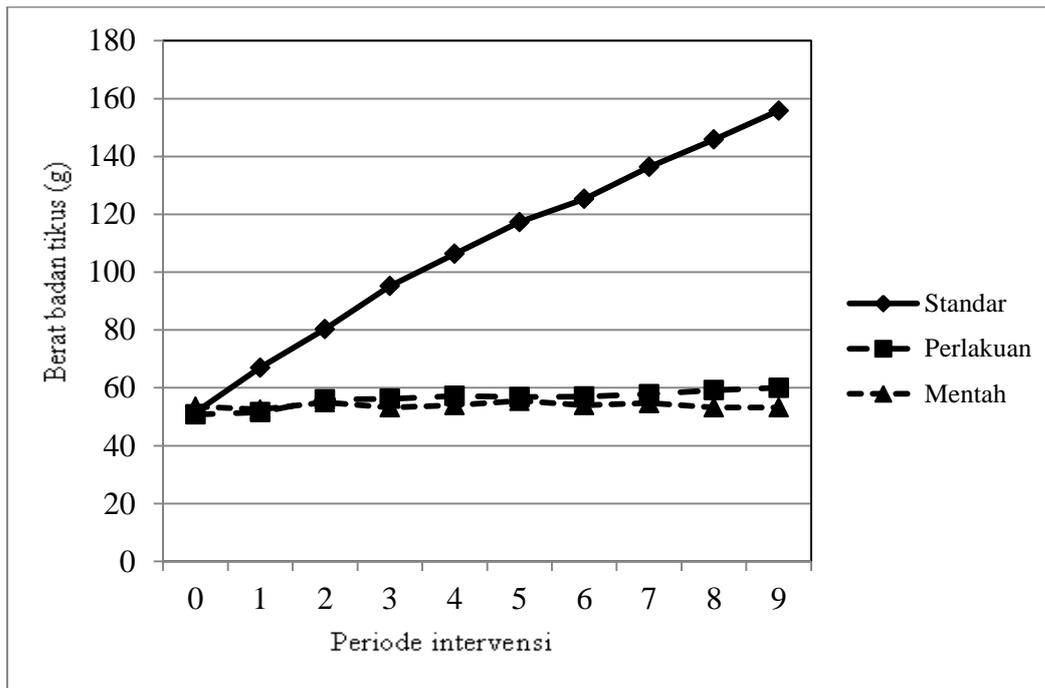
Aktivitas enzim lipoksigenase dapat diturunkan dengan pemberian perlakuan pemanasan. Pada penelitian ini dilakukan proses *blanching* pada tahapan awal dalam pembuatan tepung perlakuan. *Blanching* merupakan perlakuan pendahuluan yang biasa digunakan dalam pengolahan bahan segar. Salah satu fungsi dari *blanching* adalah untuk merusak aktivitas enzimatik pada produk segar seperti sayuran, buah-buahan, dan kacang-kacangan. Selain merusak aktivitas enzim,

blanching juga dapat menguapkan senyawa-senyawa volatil penyebab bau langu pada koro pedang.¹⁵

Proses *blanching* yang dilakukan pada penelitian ini dapat menurunkan tingkat keluguan pada tepung Koro Pedang Putih dan meningkatkan palatabilitas tepung Koro Pedang Putih. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan jumlah pakan yang dikonsumsi antara pakan mentah dan pakan perlakuan. Pada penelitian ini jumlah pakan yang dikonsumsi pada kelompok pakan perlakuan lebih tinggi daripada pakan mentah. Namun meskipun demikian, jumlah pakan perlakuan yang dikonsumsi pada penelitian ini masih terbilang rendah jika dibandingkan dengan jumlah pakan yang dikonsumsi pada pakan standar. Sehingga masih perlu dilakukan penelitian mengenai *treatment* yang dapat dilakukan untuk meningkatkan palatabilitas tepung Koro Pedang Putih untuk meningkatkan *intake* pakan berbasis tepung Koro Pedang Putih pada penentuan *Protein Efficiency Ratio*.

Perubahan Berat Badan Tikus Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran berat badan tikus untuk mengetahui tingkat efisiensi protein. Data berat badan selama periode intervensi merupakan salah satu indikasi dapat tidaknya pakan tersebut memenuhi kebutuhan hidup hewan percobaan, karena protein yang dikonsumsi tikus lepas saphi digunakan untuk pertumbuhan, pemeliharaan sel dan penggantian jaringan yang rusak. Data perubahan berat badan tikus percobaan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Berat badan tikus selama periode intervensi

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada awal perlakuan rata-rata berat badan antar kelompok tikus tidak menunjukkan perbedaan. Hasil pengukuran berat badan selama periode intervensi menunjukkan bahwa kelompok tikus standar mengalami peningkatan berat badan yang sangat besar dibanding dengan kelompok tikus perlakuan dan mentah. Sedangkan kelompok tikus perlakuan mengalami pertambahan berat badan lebih tinggi dibanding kelompok tikus yang diberi pakan mengandung koro pedang mentah. Hal ini tampaknya disebabkan oleh banyaknya pakan yang dikonsumsi. Kelompok tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang mentah mengonsumsi pakan lebih sedikit dibanding dengan pakan yang dikonsumsi kelompok tikus yang lain, oleh karena itu peningkatan berat badannya juga paling rendah. Sedangkan kelompok tikus perlakuan mengonsumsi pakan lebih banyak dari pada kelompok tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang mentah, oleh karena itu pertambahan berat badannya sedikit lebih banyak, namun lebih kecil

dibanding pertambahan berat badan kelompok tikus standar.

Protein Efficiency Ratio (PER)

Nilai *protein efficiency ratio* (PER) menunjukkan pengaruh konsumsi protein suatu bahan makanan terhadap pertumbuhan hewan coba. Nilai PER suatu makanan adalah hasil pembagian besarnya pertambahan berat dengan jumlah konsumsi protein dalam pakan yang diberikan pada tikus.

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan selama penelitian dan perhitungan diperoleh data konsumsi protein pada masing-masing perlakuan yang dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3 tersebut diketahui bahwa total konsumsi protein tertinggi selama penelitian dicapai oleh kelompok tikus kontrol yaitu sebanyak 43,35 gram dan rata-rata konsumsi protein terendah dicapai oleh kelompok tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang mentah yaitu sebanyak 19,48 gram. Sedangkan kelompok tikus perlakuan mengonsumsi protein sebanyak 26,95 gram.

Tabel 3. Konsumsi protein selama periode intervensi

Periode ke-	Kel. Pakan Kontrol	Kel. Pakan koro pedang perlakuan	Kel. Pakan koro pedang mentah
1	3,87	1,87	1,54
2	4,41	3,00	2,15
3	5,03	3,17	2,09
4	5,07	2,99	2,34
5	4,41	3,19	2,32
6	4,78	3,09	2,44
7	4,78	2,90	2,23
8	5,69	3,38	2,15
9	5,59	3,35	2,22
Jumlah	43,63	26,94	19,48

Berdasarkan konsumsi protein dan pertambahan berat badan tikus, maka nilai PER dapat dihitung, dan hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 4. Dari Tabel 4 tersebut dapat diketahui bahwa nilai PER standar (kasein) pada penelitian ini sebesar 2,36 sedangkan nilai PER kelompok tikus

perlakuan sebesar 0,34 dan kelompok tikus yang diberi pakan mengandung tepung koro pedang mentah sebesar -0,01. Nilai PER tepung Koro Pedang Putih (*Canavalia ensiformis* L.) perlakuan hasil penelitian ini mendekati nilai PER *Canavalia maritima* yaitu 0,38.¹⁶

Tabel 4. Nilai PER Tikus Perlakuan

Kelompok perlakuan	Nilai PER	Nilai PER Terkoreksi
Standar (Kasein)	2,39	2,50
Tepung koro pedang perlakuan	0,34	0,36
Tepung koro pedang mentah	-0,01	-0,01

Perbedaan nilai PER antara kasein dan tepung koro pedang menunjukkan perbedaan kualitas protein dari kedua bahan tersebut. Perbedaan kualitas protein tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan jumlah dan jenis asam amino yang terkandung dalam kasein dan dalam Koro Pedang Putih Kasein merupakan protein hewani yang memiliki komposisi asam amino lengkap, sedangkan koro pedang merupakan sumber protein nabati. Nilai gizi protein sebagian besar tergantung pada susunan serta konsentrasi asam amino esensialnya.⁶ Sebagian besar protein nabati, termasuk koro pedang, kekurangan satu atau lebih asam amino esensial. Koro pedang kekurangan asam

amino Isoleusin dan Methionin.² Hal ini dapat memengaruhi penggunaan protein tersebut di dalam tubuh.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan nilai PER antara tepung koro pedang mentah dengan tepung koro pedang perlakuan. Nilai PER yang didapatkan untuk tepung koro pedang mentah -0,01. Nilai minus ini terjadi karena berat tikus pada akhir penelitian lebih rendah daripada berat tikus pada awal penelitian.

Nilai PER yang didapatkan untuk tepung koro pedang perlakuan sebesar 0,36. Meskipun nilai ini lebih tinggi daripada nilai PER tepung koro pedang mentah, namun nilai PER ini sangat rendah bila dibandingkan

dengan nilai PER sumber protein lain. Nilai protein untuk sumber protein hewani seperti telur, ikan, dan daging relatif tinggi yaitu berturut-turut sebesar 3,92; 3,55; dan 2,30, sedangkan sumber protein nabati lain meskipun memiliki nilai PER yang tidak setinggi protein hewani, tetapi masih dapat dikategorikan sebagai sumber protein yang baik. Nilai PER kacang kedelai adalah 2,32; jagung sebesar 1,12 dan beras sebesar 2,18.¹⁷ Rendahnya nilai PER tepung koro pedang kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal, antara lain masih adanya bau langu pada tepung koro pedang sehingga tikus tidak bernafsu untuk mengonsumsi akibatnya pakan yang dikonsumsi jumlahnya tidak memenuhi kebutuhan pakan untuk mencukupi kebutuhan energi basalnya, tingkat pencernaan protein yang rendah yaitu sebesar 24,74% untuk isolat protein (Agnes-Murdiati *not published*), dan adanya senyawa anti gizi pada tepung koro pedang yang tidak hilang dengan perlakuan yang diberikan.

Nilai NPU tepung koro pedang adalah 25,3-27,2%.¹⁸ Nilai NPU menunjukkan perbandingan jumlah protein yang dapat digunakan oleh tubuh jumlah protein yang dikonsumsi.⁶ Selain rendahnya tingkat pencernaan protein, keberadaan zat anti gizi juga dapat menyebabkan rendahnya nilai PER pada tepung koro pedang. Salah satu zat anti gizi yang terdapat pada Koro Pedang Putih adalah anti-tripsin atau *trypsin inhibitor*.¹⁸ Anti-tripsin merupakan senyawa anti gizi yang umum terdapat pada kacang-kacangan. Senyawa ini dapat memengaruhi penggunaan protein dan metabolisme tubuh.¹⁹

Penelitian lain menunjukkan bahwa perlakuan perendaman dan perebusan dapat menurunkan kandungan anti-tripsin pada legum.²⁰ Pada penelitian ini sudah dilakukan perlakuan *blanching* dan perendaman yang dapat menurunkan kandungan anti-tripsin

pada biji koro pedang. Namun, tampaknya perlakuan *blanching* selama 10 menit yang dilakukan pada penelitian ini belum mampu menghilangkan senyawa anti-tripsin yang terdapat pada biji Koro Pedang Putih.

SIMPULAN

Berdasar hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tepung Koro Pedang Putih yang diperoleh dari perlakuan blansing selama 10 menit dan perendaman selama 48 jam dengan penggantian air perendam setiap 12 jam mempunyai nilai PER yang rendah (0,34). Hal ini menunjukkan bahwa protein Koro Pedang Putih tidak dapat diandalkan sebagai pangan sumber protein tunggal namun harus dikonsumsi bersama-sama dengan sumber protein lain untuk meningkatkan kualitas proteinnya.

Guna memanfaatkan kandungan protein yang terdapat dalam koro pedang dan meningkatkan kualitas proteinnya perlu dilakukan kombinasi dengan pangan sumber protein lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Simlitabmas melalui Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) UGM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Perspektif Baru Pembangunan untuk Menanggulangi Krisis Pangan dan Energi. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2008.
2. Sridhar, K.R., dan Seena S.. Nutritional and antinutritional significance of Four Unconventional Legumes of The Genus *Canavalia* – A Comparative Study. *Journal of Food Chemistry*;2006;99:267-288.
3. Anonim, 2013. Pengolahan Kacang Koro Pedang. <http://cangkordang.blogspot.-com/p/pengolahan.html>. Diakses pada 7 April 2014.

4. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C;1990
5. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., dan Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. Agricultural research service, United States Departement of Agriculture; 1993.
6. Pellet, P.L., dan Young, V.R. Nutritional Evaluation of Protein Foods, Tokyo:The United Nations University; 1980.
7. Windrati, W. S., Navi, A., dan Augustin, D., Sifat Nutrisional Protein Rich Flour (PRF) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis L.*). Agrotek;2010; 4(1): 18-26.
8. Kandil, A., Li, Jihong., Vasanthan, T., Blessler, D. C., dan Tyler. R.T.,. Compositional changes in whole grain flours as a result of solvent washing and their effect on starch amylolysis. Food Research International Journal;2011;44: 167-173.
9. Lasztiti, R., Ammar, A., dan El-kady, S.A.. Biochemical Changes of Green Peas During Processing and Storage.Department of Biochemistry and Food Technology, Technical University, H-1521 Budapest; 1985.
10. Pujola, M., Farreras, A., dan Casanas, F. Protein and Starch Content of raw, soaked, and cooked beans (*Phaseolus vulgaris L.*). Journal of Food Chemistry; 2007;102: 1034-1041.
11. Bayram, M., Kaya, A., dan Oner, M.D. Changes in Properties of Soaking Water during Production of Soy-bulgur. Journal of Food Engineering; 2004;61: 221-230.
12. Adelakun, O.E., Ade-Omowaye, B. I. O., Adeyemi, I. A., dan Van de Venter, M. Mineral Composition and the Functional Attributes of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus Moench*) flour. Food Research International;2012;47: 348 – 352.
13. Adeparusi, E.O., Effect of Processing on the Nutrients and Anti-nutrients of Lima Bean (*Phaseolus linatus L.*) Flour. Nahrung Food; 2001;45:94-96.
14. Diliara, R. I., Johnson, L. A., Hammond. E. G., dan Beattle, S. E. Evidence of an Enzymatic Source of Off Flavors in “Lipoxygenase-Null” Soybeans. Journal American Oil Chemistry Society; 2009;86: 59-64.
15. Anese, M., dan Sovrano, S. Kinetics of Thermal Inactivation of Tomato Lipoxygenase. Food Chemistry; 2006; 95: 131-137.
16. Seena, S., Sridhar K.R., dan Ramesh S.R. Nutritional and protein quality evaluation of thermally treated seeds of *Canavalia maritima* in the rat. Nutrition Research Journal;2005;25:587-596.
17. Broody, T.,. Nutritional Biochemistry. California: Academic Press.
18. Agbede, J.O. and V.A. Aletor, 2005. Studies of thechemical composition and protein quality evaluationof differently processed*Canavalia ensiformis*and*Mucuna pruriens*seed flours. J. Food Comp. Anal;1994;18:89-103.
19. Zuheid-Noor. *Senyawa Anti Gizi*. Pusat Antar Universitas – Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada;1992.
20. Wang, N., Hatcher, D.W., Tyler, R. T., Toews, R., dan Gawalko, E.J.,. Effect of Cooking on the Composition of Beans (*Phaseolus vulgaris L.*) and Chickpeas (*Cicer arietinum L.*). Food Research International;2010;43:589 – 594.