

## Peran Sitogloblin dalam Mencegah Stres Oksidatif

Asri Werdhasari<sup>1,2</sup>, Ani Retno Prijanti<sup>2</sup>, Sri Widia A Jusman<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Puslitbang Biomedik dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes Kemenkes RI

<sup>2</sup> Departemen Biokimia & Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Email address: asriwerdhasari@yahoo.com

### Abstract

*The aim of this study are to analyze the expression of Cygb in rat liver under oxidative stress induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and protection with antioxidant N-acetyl cystein before and after induction. The study is conducted on Sprague-Dawley male rats which are divided into 5 groups: control; given N-Acetyl cystein (NAC) before induced by CCl<sub>4</sub>; given N-Acetyl cystein (NAC) after induced by CCl<sub>4</sub>; induced by CCl<sub>4</sub> without NAC and received coconut oil, the solvent of CCl<sub>4</sub>. The activity of catalase and concentration dicarbonyl compound in rat liver tissue are measured spectrophotometrically, as markers of oxidative stress, and titer of Cygb is determined by ELISA method. Data are analyzed statistically. Result showed that oxidative stress present in rat liver induced by CCl<sub>4</sub> which is showed by lowest specific activity of catalase (4.677±1.092) and highest concentration of dicarbonyl compound (10.989±2.243), significantly different compared to the other group. The oxidative stress parameters in rat that has been given N-acetyl cystein before and after induction of CCl<sub>4</sub> showed no significant difference with the first and the fifth group. But, specific activity of catalase in rat given NAC after induction of CCl<sub>4</sub> was higher compared to the group given NAC before CCl<sub>4</sub> induction. Titres of Cygb protein are lower in groups induced by CCl<sub>4</sub>, treated with NAC before and after CCl<sub>4</sub> induction are 16; 5.28 and 8 respectively. It is concluded expression of cytoglobin protein is decreased in oxidative stressed liver and protection with antioxidant NAC did not increase the titer of Cygb protein.*

**Key words:** *Cytoglobin protein, oxidative stress, carbon tetrachloride, N-acetyl cystein.*

### Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis ekspresi protein sitogloblin pada tikus yang diinduksi stres oksidatif dengan CCl<sub>4</sub> dan perlindungan N-asetil sistein (NAC) sebelum dan sesudah induksi. Penelitian ini dilakukan terhadap tikus Sprague-Dawley jantan yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan: kontrol; diberikan NAC sebelum induksi CCl<sub>4</sub>; diberi NAC sesudah induksi CCl<sub>4</sub>; diinduksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC; dan diberikan minyak kelapa (pelarut CCl<sub>4</sub>). Aktivitas katalase dan konsentrasi dikarbonil pada jaringan hati tikus diukur dengan metode spektrofotometri, sebagai penanda stres oksidatif. Titer protein sitogloblin diukur dengan metode ELISA. Data dianalisis secara statistik. Hasil menunjukkan bahwa stres oksidatif tampak pada hati tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub> dengan rendahnya aktifitas katalase (4,677+1,092) dan meningkatnya konsentrasi senyawa dikarbonil (10,989+2,243), berbeda bermakna dengan kelompok lain. Parameter stres oksidatif pada tikus yang diberikan NAC sebelum dan sesudah induksi dengan CCl<sub>4</sub> menunjukkan tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol dan kelompok yang hanya diberikan minyak kelapa. Namun aktifitas katalase pada tikus yang diberikan NAC setelah induksi CCl<sub>4</sub> lebih tinggi dibandingkan yang diberikan sebelum induksi CCl<sub>4</sub>. Kadar protein sitogloblin lebih rendah pada kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> baik diberi NAC maupun tidak. Dapat disimpulkan bahwa ekspresi sitogloblin menurun pada hati yang mengalami stres oksidatif dan perlindungan dengan NAC tidak meningkatkan kadar protein sitogloblin.

**Kata kunci:** *protein sitogloblin, stres oksidatif, karbon tetraklorida, n-asetil sistein.*

## Pendahuluan

Sitoglobin (Cygb) adalah salah satu protein globin terbaru yang ditemukan pada vertebrata. Ekspresi gen Cygb tersebar luas di seluruh jaringan tubuh mamalia.<sup>1,2,3</sup> Hampir semua globin yang telah diketahui perannya bertugas menjalankan fungsi yang berhubungan dengan transpor atau penyimpanan O<sub>2</sub> karena dapat mengikat O<sub>2</sub> secara reversibel melalui atom Fe yang terdapat pada cincin porfirin dari gugus hem.<sup>1</sup> Cygb mempunyai 40% kesamaan susunan asam amino dengan mioglobulin (Mb).<sup>4</sup> Hemoglobin (Hb) adalah protein globin yang terdapat di dalam sel darah merah, berperan mengangkut O<sub>2</sub> dari organ pernafasan ke jaringan melalui sistem sirkulasi, dan mengangkut CO<sub>2</sub> pada arah pengangkutan sebaliknya. Mioglobulin dengan struktur monomer terutama terdapat di otot jantung dan otot rangka, berfungsi sebagai tempat menyimpan O<sub>2</sub> lokal dan memfasilitasi difusi intraseluler gas O<sub>2</sub> ke mitokondria. Neuroglobin (Ngb) banyak terdapat di jaringan saraf dan retina.<sup>1</sup> Hb, Mb, dan Ngb selain berfungsi dalam transpor O<sub>2</sub> juga mempunyai sifat sebagai *scavenger* peroksida.<sup>5,6</sup>

Hasil penemuan Cygb di nukleus oleh Geuens<sup>1</sup> memberi suatu pandangan tentang fungsinya sebagai regulator transkripsi. Namun Schmidt tidak menemukannya di nukleus, melainkan di sitoplasma jaringan penyambung, *fibroblast*, *chondroblasts*, *osteoblasts* dan *hepatic stellate cells* (HSCs).<sup>3,7</sup> Tetapi pada jaringan saraf sentral dan perifer, Cygb diekspresikan di sitoplasma dan nukleus.<sup>3</sup> Perbedaan ekspresi ini mungkin dikarenakan perbedaan fungsi masing-masing jaringan.

Masih terdapat berbagai kontroversi tentang fungsi Cygb, juga tentang peningkatan atau penurunan ekspresinya dalam suatu keadaan. Terdapat pendapat yang menyatakan bahwa Cygb berperan mencegah kerusakan sel, namun ada juga pendapat lain yang menyatakan bahwa Cygb berperan dalam pembentukan

fibrosis hati yang prosesnya membutuhkan ketersediaan oksigen. Peningkatan ekspresi Cygb yang menyebabkan fibrosis atau suatu mekanisme pertahanan untuk menghindari kerusakan sel, masih belum diketahui secara pasti. Penelitian ini dilakukan untuk melihat peran Cygb pada stres oksidatif.

## Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo*. Untuk mengetahui ekspresi Cygb pada tikus yang diinduksi stres oksidatif menggunakan CCl<sub>4</sub> dan yang diberi antioksidan, dilakukan pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase, kadar senyawa dikarbonil, dan titer protein Cygb pada jaringan hati.

Sebanyak 25 ekor tikus strain *Sprague-Dawley* dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Tikus kelompok kontrol hanya diberikan diet oral biasa selama 10 hari. Kelompok perlakuan (Kelompok A, B, C) mendapatkan CCl<sub>4</sub> yang dilarutkan dalam minyak kelapa dengan dosis 0,55mg/kgBB (0,345mL/kgBB) pada hari ke-8. Kelompok A mendapat N-asetil sistein (NAC) dengan merk dagang Hidonac®, dengan dosis 0,15mg/g BB tikus (dilarutkan dalam NaCl 0,9%), diberikan secara intravena (IV) sejak hari pertama sampai hari ke-8. Kelompok B mendapat NAC 2 hari setelah pemberian CCl<sub>4</sub>. Kelompok C hanya mendapatkan CCl<sub>4</sub> tanpa NAC. Kelompok D mendapat minyak kelapa tanpa CCl<sub>4</sub>. Pada hari ke-10 dilakukan euthanasia dengan eter, kemudian tikus dibedah, dan jaringan hati disisihkan. Jaringan hati ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dilumatkan, supernatan diambil dan disimpan dalam suhu -20°C.

Aktivitas enzim katalase dan penetapan kadar karbonil menggunakan metode spektrofotometri. Aktivitas katalase dengan cara mereaksikan homogenat sampel dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sedangkan prosedur untuk mendeteksi dan mengukur kadar kandungan karbonil adalah dengan mereaksikan 2,4-

dinitrofenilhidrazin (DNPH) dengan karbonil protein. Pemeriksaan titer Cygb dengan menggunakan teknik *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

Data merupakan data numerik dan mempunyai sebaran normal maka analisis dilakukan dengan uji parametrik Anova. Analisis selanjutnya adalah menggunakan *post hoc test* dan uji korelasi menggunakan Pearson.

## Hasil

### Aktivitas Spesifik Enzim Katalase

Hasil pengukuran aktivitas enzim katalase disajikan dalam Tabel 1. Terlihat bahwa aktivitas spesifik rata-rata enzim

katalase pada kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> (kel C) dan juga pada kelompok yang diberi perlindungan NAC sebelum induksi CCl<sub>4</sub> (kel A) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Pada kelompok B, NAC diberikan setelah induksi CCl<sub>4</sub>, terlihat aktivitas spesifik rata-rata enzim katalase lebih tinggi mendekati kontrol, sehingga tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok B dengan kontrol. Aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok kontrol hampir sama dengan kelompok yang hanya diberi pelarut minyak kelapa (kel D).

**Tabel 1.**  
**Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Jaringan Hati Tikus Kontrol dan Perlakuan (U/g Protein)**

No	K (n=5)	A (n=5)	B (n=5)	C (n=5)	D (n=5)
1	12,709	4,968	8,571	4,627	8,674
2	9,549	7,706	8,755	3,583	12,91
3	7,537	5,069	5,998	6,347	9,951
4	8,639	4,574	11,45	3,849	12,31
5	8,003	6,260	8,595	4,977	5,624
<b>Rerata ±SD</b>	<b>9,287±2,0 56*</b>	<b>5,716±1,2 8**</b>	<b>8,673±1,9 3*</b>	<b>4,677±1, 09**</b>	<b>9,894±2, 9*</b>

Keterangan:

K=Kontrol; A=Diberi antioksidan (NAC) sebelum induksi CCl<sub>4</sub>; B=Diberi NAC sesudah induksi CCl<sub>4</sub>; C=Induksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC; D=kontrol minyak.

Terdapat perbedaan aktivitas spesifik enzim katalase yang bermakna (Anova, p= 0,001).

\* Berbeda bermakna dengan A dan C

\*\* Berbeda bermakna dengan K, B, dan D

Hasil uji Anova menunjukkan terdapat perbedaan aktivitas spesifik yang bermakna antara 2 kelompok K, D dan B dengan kelompok C dan A. Terlihat tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok A dan C (p=0,415), serta antara kelompok K, B dan D. Namun, walau tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok A dan C, terdapat kecenderungan aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok yang diberi

perlindungan NAC sebelum induksi CCl<sub>4</sub> lebih tinggi dari pada tanpa NAC.

### Kadar Senyawa Dikarbonil

Kandungan senyawa dikarbonil sebagai penanda kerusakan oksidatif makromolekul, terutama protein. Kandungan senyawa ini dinyatakan dalam µmol/g protein. Hasil pengukuran kadar senyawa dikarbonil pada jaringan hati ditampilkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.**  
**Kadar Senyawa Dikarbonil pada Jaringan Hati Tikus Kontrol dan Perlakuan ( $\mu\text{mol/g}$ )**

No	K (n=5)	A (n=5)	B (n=5)	C (n=5)	D (n=5)
1	5,866	4,607	7,506	12,073	2,319
2	5,739	9,406	6,903	8,800	5,136
3	5,948	7,843	8,981	10,389	5,980
4	4,891	9,952	6,675	9,358	6,665
5	7,431	6,610	5,139	14,327	4,735
<b>Rerata<math>\pm</math></b>	<b>5,98<math>\pm</math>0,9</b>	<b>7,68<math>\pm</math>2,1</b>	<b>7,04<math>\pm</math>1,3</b>	<b>10,99<math>\pm</math>2,2</b>	<b>4,97<math>\pm</math>1,67</b>
<b>SD</b>	<b>2<sup>*</sup></b>	<b>7<sup>**</sup></b>	<b>9<sup>*</sup></b>	<b>4<sup>^</sup></b>	<b>^<sup>^</sup></b>

Keterangan:

K= Kontrol; A=Diberi antioksidan (NAC) sebelum induksi  $\text{CCl}_4$ ; B= Diberi NAC sesudah induksi  $\text{CCl}_4$ ; C= Induksi  $\text{CCl}_4$  tanpa NAC; D= kontrol minyak.

Terdapat perbedaan kadar senyawa dikarbonil pada jaringan hati yang bermakna (Anova,  $p=0,000$ ).

\* berbeda bermakna dengan C

\*\* berbeda bermakna dengan C dan D

<sup>^</sup> berbeda bermakna dengan K, A, B, D

<sup>^^</sup> berbeda bermakna dengan A, B dan C

Terlihat bahwa kadar senyawa dikarbonil pada kelompok yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  secara bermakna berbeda dari kontrol dan memiliki kadar dikarbonil tertinggi. Tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  dengan perlindungan NAC sebelum induksi dan sesudah induksi. Hasil analisis *post hoc* menunjukkan tidak terdapat perbedaan kadar senyawa dikarbonil yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang hanya diberi minyak dan diberi perlindungan NAC sebelum dan setelah induksi  $\text{CCl}_4$ . Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok yang diberi NAC sebelum diinduksi  $\text{CCl}_4$

dengan sesudah induksi ( $p=0,567$ ). Namun, pada kelompok yang diberi NAC sebelum induksi, terdapat kecenderungan kadar senyawa dikarbonil lebih tinggi dari pada yang diberi NAC setelah induksi.

#### **Titer protein Cygb**

Keberadaan protein Cygb dideteksi dengan metode ELISA dan diukur sampai titrasi ke berapakah protein Cygb tidak lagi terdeteksi. Semakin tinggi titer Cygb menunjukkan semakin banyak kandungan protein Cygb dalam sampel tersebut. Hasil titrasi dengan metode ELISA ditunjukkan pada Tabel 3.

**Tabel 3.**  
**Log (2) Titer dan Titer Protein Cygb Pada Jaringan Hati Tikus**  
**Kontrol dan Perlakuan**

No	K (n=5)	A (n=5)	B (n=5)	C (n=4)	D (n=4)
1	5	3	2		
2	5	3	4	4	6
3	5	2	4	4	6
4	4	2	2	4	6
5	4	2	1	4	5
	<b>4,6±0,5*</b>	<b>2,4±0,5</b>	<b>2,6±1,3</b>		<b>5,75±0,5*</b>
<b>Rerata±SD</b>	*	<b>5**</b>	<b>4*</b>	<b>4*</b>	**
<b>Titer Cygb</b>	<b>24,25</b>	<b>5,28</b>	<b>6,06</b>	<b>16</b>	<b>53,82</b>

Keterangan:

K= Kontrol; A= Diberi antioksidan (NAC) sebelum induksi CCl<sub>4</sub>; B= Diberi NAC sesudah induksi CCl<sub>4</sub>; C= Induksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC; D= kontrol minyak.

Terdapat perbedaan titer protein Cygb pada jaringan hati yang bermakna (Anova, p=0,000).

\*Berbeda bermakna dengan A, B dan D

\*\* Berbeda bermakna dengan K, C dan D

\*\*\* Berbeda bermakna dengan K, A, B dan C

Hasil titrasi protein Cygb dengan menggunakan metode ELISA menunjukkan titer protein Cygb tertinggi terdapat pada sampel kelompok yang diberikan minyak kelapa, diikuti oleh kelompok kontrol. Induksi dengan CCl<sub>4</sub> menyebabkan kadar protein Cygb menurun, dan dengan pemberian antioksidan NAC menunjukkan titer Cygb lebih rendah daripada tanpa NAC. Hasil uji menunjukkan setidaknya terdapat perbedaan titer protein Cygb yang bermakna antara dua kelompok perlakuan (p=0,000). Terdapat perbedaan titer protein Cygb yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi perlindungan NAC sebelum maupun sesudah induksi dan kelompok yang diberikan minyak kelapa. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dengan perlindungan NAC sebelum maupun sesudah induksi CCl<sub>4</sub>. Terdapat kecenderungan titer protein Cygb yang lebih rendah pada tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.

## Pembahasan

### Stres Oksidatif pada Induksi CCl<sub>4</sub>

Pemberian CCl<sub>4</sub> 0,345mL/kg BB menyebabkan stres oksidatif ditandai oleh penurunan aktivitas spesifik enzim katalase dan meningkatnya kadar senyawa dikarbonil. Kadar dikarbonil merupakan penanda terjadinya kerusakan oksidatif makromolekul, terutama protein.<sup>8</sup> Pada stres oksidatif, peningkatan kerusakan oksidatif protein ini tidak dimbangi dengan peningkatan aktivitas enzim antioksidan. Penurunan aktivitas enzim ini menunjukkan enzim katalase dalam sel banyak terpakai untuk mengatasi spesies oksigen reaktif (ROS) dalam sel. Hal ini tampak terjadi pada kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> tanpa perlindungan NAC dengan dosis 150mg/kg BB. Terlihat pemberian NAC melindungi sel dari kerusakan yang diakibatkan oleh CCl<sub>4</sub>.

Terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase yang bermakna pada kelompok yang diberi NAC sebelum diinduksi CCl<sub>4</sub>, dibandingkan dengan kontrol dan kelompok yang diberi NAC setelah induksi CCl<sub>4</sub>. Namun penurunan

ini dibarengi dengan kadar senyawa dikarbonil yang tidak berbeda bermakna antara ketiga kelompok tersebut, menunjukkan bahwa aktivitas enzim katalase mampu mengatasi  $H_2O_2$  yang ditimbulkan oleh induksi  $CCl_4$ . Sehingga pada kelompok yang diberi NAC sebelum diinduksi  $CCl_4$ , penurunan aktivitas spesifik enzim katalase tidak menyebabkan peningkatan kerusakan oksidatif makromolekul dalam sel.

Pemberian NAC sebelum induksi  $CCl_4$  bersifat melindungi sel dengan meningkatkan kemampuan antioksidan endogen untuk mengatasi serangan radikal bebas dan akan meningkatkan kadar sistein endogen, sehingga NAC merupakan prekursor pembentukan glutathion.<sup>9</sup> Lean JM melaporkan bahwa pemberian NAC meningkatkan konsentrasi glutathion sehingga mencegah kehilangan massa tulang pada tikus dengan ovariectomi.<sup>10</sup> Jusman juga melaporkan bahwa pemberian NAC sebelum atau sesudah  $CCl_4$  meningkatkan kadar GSH pada jaringan hati dibandingkan dengan induksi  $CCl_4$  tanpa diberikan NAC.<sup>11</sup> Terjadi penurunan kadar GSH jika dibandingkan dengan kontrol, namun tidak serendah induksi  $CCl_4$  tanpa NAC. Kemungkinan GSH tidak terlalu banyak terpakai atau cadangan GSH cukup karena NAC juga bisa menjadi prekursor pembentukan GSH.

Pada kelompok yang diberi NAC setelah diinduksi  $CCl_4$  terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase yang tidak bermakna jika dibandingkan dengan kontrol, namun terjadi sedikit peningkatan kerusakan oksidatif makromolekul yang juga tidak bermakna. Hal ini menunjukkan NAC yang diberikan setelah induksi  $CCl_4$  bersifat melindungi sel. Gugus thiol pada NAC dapat berperan sebagai *scavenger* radikal bebas, sehingga antioksidan endogen seperti katalase tidak banyak terpakai untuk mengatasi  $H_2O_2$  yang terbentuk. Tampak kecenderungan bahwa pemberian NAC sebagai efek terapi mempunyai perlindungan yang lebih baik terhadap kerusakan oksidatif sel, jika

dibandingkan dengan efek preventif. Namun kerusakan oksidatif yang terjadi pada jaringan dengan kedua cara pemberian NAC ini sangat rendah dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi tanpa dilindungi NAC. Hasil ini sesuai dengan Kamalakkannan yang melaporkan bahwa pemberian NAC dengan dosis 150 mg/kg BB pada hewan coba yang diinduksi  $CCl_4$  menyebabkan menurunnya enzim petanda kerusakan hati di plasma dan kadar peroksidasi lipid yang menunjukkan status stres oksidatif. Dua jenis penanda kerusakan sel ini tidak berbeda bermakna antara tikus kontrol normal dengan tikus yang diinduksi  $CCl_4$  bersamaan dengan pemberian NAC.<sup>12</sup>

Peningkatan kandungan senyawa dikarbonil dalam sel menggambarkan keparahan kerusakan sel. Kerusakan sel juga ditandai oleh peningkatan kadar malondialdehid (MDA), yaitu suatu hasil dari peroksidasi lipid. Jusman melaporkan pemberian  $CCl_4$  meningkatkan kadar MDA dibandingkan kelompok yang diberi NAC dan kontrol.<sup>11</sup> Tampak bahwa kenaikan kadar senyawa dikarbonil paralel dengan kenaikan kadar MDA.

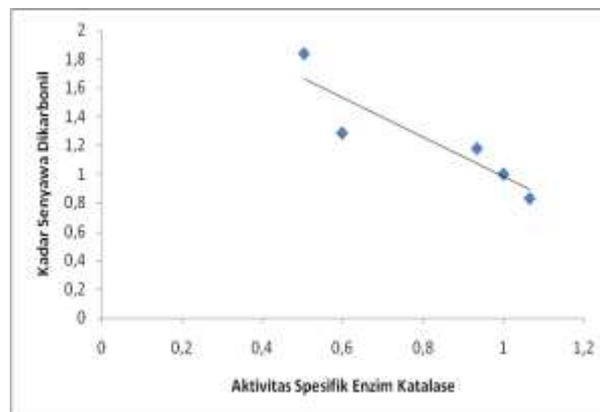
Dalam retikulum endoplasma hati,  $CCl_4$  dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) menjadi radikal bebas triklorometil ( $CCl_3\cdot$ ). Radikal triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi ( $CCl_3OO\cdot$ ) yang dapat menyebabkan peroksidasi lipid sehingga merusak lipid membran dan akhirnya menyebabkan kematian sel.<sup>13</sup>

Pemberian  $CCl_4$  dilakukan dengan melarutkannya dalam minyak kelapa. Tampak stres oksidatif yang terjadi pada tikus yang diinduksi  $CCl_4$  tidak disebabkan oleh minyak kelapa. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kandungan dikarbonil pada kelompok yang hanya diberikan minyak kelapa tidak berbeda bermakna dengan kontrol, namun menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase dan penurunan kandungan senyawa dikarbonil. Jusman juga

melaporkan bahwa kadar MDA terendah juga ditemukan pada kelompok ini.<sup>11</sup> Rendahnya kadar MDA menunjukkan tingkat stres oksidatif pada kelompok ini lebih rendah dari pada kelompok perlakuan dan kontrol. Hal ini senada dengan penelitian Dosumu, bahwa pemberian minyak kelapa (*virgin coconut oil*) pada hewan coba yang diinduksi stress oksidatif menggunakan alkohol terbukti menurunkan senyawa hasil peroksidasi lipid pada jaringan testis yang diperiksa dan memperbaiki kadar testosteron yang terganggu akibat pemberian alkohol. Jadi, stres oksidatif yang terjadi pada kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> adalah memang disebabkan oleh CCl<sub>4</sub> itu sendiri.

Di pihak lain, korelasi antara aktivitas spesifik enzim katalase dengan kandungan senyawa dikarbonil, menunjukkan korelasi

negatif yang bermakna dengan kekuatan sedang ( $p=0,009$ ;  $r= -0,512$ ). Hasil korelasi ini menunjukkan semakin tinggi kandungan senyawa dikarbonil maka akan semakin rendah aktivitas spesifik enzim katalasenya dikarenakan banyaknya enzim katalase yang terpakai untuk mengatasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang terbentuk. Ketidakseimbangan antara banyaknya radikal bebas dalam sel dengan aktivitas enzim sebagai antioksidan endogen dapat menyebabkan terjadinya kondisi stres oksidatif. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase dengan kandungan senyawa dikarbonil ditampilkan dalam gambar 1.



**Gambar 1.**  
**Hubungan Antara Aktivitas Spesifik Enzim Katalase dengan Kandungan Senyawa Dikarbonil (Pearson:  $r= -0,512$ ;  $p=0,009$ )**

### **Ekspresi Protein Cygb pada Stres Oksidatif Pasca Induksi CCl<sub>4</sub>**

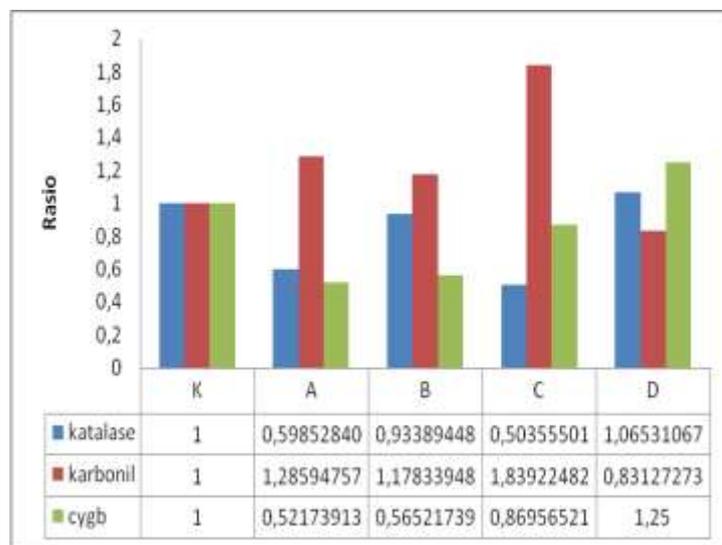
Terjadi penurunan ekspresi protein Cygb pada tikus yang mengalami stres oksidatif, dibandingkan dengan tikus normal. Hal ini sesuai dengan penelitian Man bahwa pemberian CCl<sub>4</sub> 1mL/kg BB menyebabkan fibrosis jaringan hati dan meningkatkan ekspresi gen Cygb pada 3

jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam setelah intoksikasi akut CCl<sub>4</sub>. Namun setelah 48 jam intoksikasi CCl<sub>4</sub> terlihat penurunan mRNA yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol.<sup>15</sup> Sementara, pada penelitian ini euthanasia dilakukan pada hari ke-2 setelah induksi CCl<sub>4</sub>. Maka, pada hari ke-2 didapatkan ekspresi Cygb yang sudah menurun.

Gambar 2 menunjukkan terdapat kecenderungan menurunnya kadar protein Cygb pada hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>, baik yang dilindungi NAC maupun tidak. Tidak ada perbedaan yang bermakna antara titer protein Cygb pada kelompok dengan perlindungan NAC sebelum maupun sesudah induksi CCl<sub>4</sub>, namun titer protein Cygb pada kedua kelompok ini lebih rendah secara bermakna daripada yang diinduksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC.

Perbedaan titer protein Cvgb dapat terjadi karena peningkatan ekspresinya pada hati tikus yang diberi NAC sebelum 48jam tidak setinggi yang diinduksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC. Kemungkinan penurunan ekspresi Cygb pada 48jam ini terjadi pada semua hati tikus yang terintoksikasi CCl<sub>4</sub>, baik diberi NAC maupun tidak. Sehingga karena peningkatan ekspresi mRNA pada induksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC sampai 24 jam kemungkinan lebih tinggi daripada yang diberikan NAC, maka titer proteinnya pun tetap lebih banyak daripada yang diberi NAC.

Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Jusman, dkk yaitu ekspresi mRNA Cygb pada kelompok yang diberi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC adalah terendah yang dapat disebabkan terjadi penurunan drastis mRNA Cygb, yang tidak dibarengi dengan penurunan titer protein Cygb. Tidak adanya penurunan titer protein Cygb menunjukkan terjadi stabilisasi protein Cygb, sebagaimana terjadi pada hipoksia hari ke-14 pada penelitian Jusman, dimana terdapat kadar mRNA Cygb terendah pada hipoksia hari ke-14, tetapi kadar protein Cygb tertinggi pada hari tersebut.<sup>11</sup> Terjadi ekspresi protein Cygb yang tinggi namun tidak paralel dengan ekspresi mRNA Cygb.<sup>11</sup> Rasio kerusakan oksidatif, pertahanan enzim antioksidan dan potein Cygb disajikan dalam gambar 2.



**Gambar 2.**  
**Rasio Aktivitas Spesifik Enzim Katalase, Kandungan Senyawa Dikarbonil dan Ekspresi Protein Cygb dalam Jaringan Hati Tikus Perlakuan dan Kontrol**

Dengan memperkirakan peningkatan ekspresinya pada hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>

dengan perlindungan NAC tidak setinggi tanpa NAC pada periode sebelum 48 jam,

menunjukkan ekspresi Cygb merupakan mekanisme pertahanan sel untuk mencegah kerusakan oksidatif akibat radikal bebas. Pada hati yang dilindungi NAC, peran sebagai antioksidan sudah diambil alih oleh NAC, sementara pada hati yang tidak dilindungi NAC namun diberi stres oksidatif, sel merespon dengan memproduksi Cygb untuk mempertahankan diri. Sehingga diperkirakan respon sel terhadap stres oksidatif terutama sebelum 48 jam, dengan mensintesis protein Cygb. Penurunan ekspresi mRNA Cygb yang sangat drastis pada induksi CCl<sub>4</sub> tanpa NAC pada hari ke-2 setelah induksi, kemungkinan terjadi sebagai mekanisme proteksi terhadap sel agar tidak terjadi sintesis kolagen yang berlebihan. Man melaporkan penurunan ini diikuti peningkatan prokolagen1 alfa1.<sup>15</sup> Hal ini menunjukkan semakin lamanya proses intoksikasi oleh CCl<sub>4</sub> menyebabkan terjadinya proses sintesis kolagen.

Hasil ini sejalan dengan penelitian Kawada, bahwa protein ini bersifat katalase dan peroksidase, sehingga diketahui berperan sebagai *scavenger* hidrogen peroksida dan lipid hidroperoksida.<sup>7</sup> Sementara Li memaparkan sel-sel N2a neuroblastoma otak tikus pada berbagai perlakuan, namun hanya perlakuan dengan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) yang menunjukkan *up-regulasi* mRNA sitogloblin secara bermakna.<sup>16</sup> Cygb-siRNA sebagai vektor yang tidak mengandung gen Cygb dapat memperburuk kematian sel selama perlakuan bersama pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>16</sup> Eksperimen serupa juga dilakukan oleh Hodges, dkk yang menunjukkan bahwa protein fusi antara Cygb dengan GFP yang diekspresikan pada nukleus di turunan sel saraf manusia TE671 mempunyai kemampuan mereduksi ROS yang diukur dengan pelacak redoxsensitif fluoresens.<sup>17</sup> Dalam gambar 2 terlihat pula kecenderungan penurunan titer protein

Cygb bersamaan dengan peningkatan kadar senyawa dikarbonil. Hal ini terjadi pada hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>, baik yang diberi NAC maupun tidak, menunjukkan semakin rendah kadar protein Cygb dalam jaringan, maka semakin tinggi pula kerusakan oksidatif yang terjadi di dalam jaringan tersebut.

Titer protein Cygb pada kelompok yang diberi NAC sebelum induksi cenderung lebih rendah dibandingkan dengan NAC setelah induksi. Pada kedua kelompok ini, tampak bahwa hati yang mempunyai titer protein Cygb lebih rendah mempunyai derajat kerusakan oksidatif yang lebih tinggi. Pemberian NAC setelah induksi diharapkan menghentikan proses stres oksidatif yang terjadi oleh induksi CCl<sub>4</sub>, karena radikal bebas yang dihasilkan oleh CCl<sub>4</sub> segera dimusnahkan oleh NAC, sehingga jaringan tidak merespon dengan menghasilkan protein Cygb yang lebih banyak dibandingkan dengan induksi tanpa NAC.

Pada kelompok yang hanya diberikan pelarut minyak kelapa, terbukti mempunyai kadar protein Cygb yang lebih tinggi daripada kelompok yang lain, sementara kerusakan oksidatif pada kelompok ini sangat rendah, artinya pada kelompok yang mempunyai titer protein Cygb tertinggi, mempunyai tingkat kerusakan oksidatif terendah. Penelitian ini menunjukkan tingginya kadar protein Cygb di dalam jaringan sebanding dengan berkurangnya tingkat kerusakan oksidatif dalam jaringan, sehingga dapat dipikirkan keberadaan protein Cygb membantu jaringan mengatasi stres oksidatif.

### Kesimpulan

Terjadi stres oksidatif pada hati yang diinduksi oleh CCl<sub>4</sub> dan terdapat penurunan titer protein Cygb pada hati yang diinduksi oleh CCl<sub>4</sub>. Penurunan titer protein Cygb sejalan dengan peningkatan kerusakan oksidatif dalam jaringan dimana

Cygb digunakan untuk mengatasi stres oksidatif dalam jaringan tersebut.

## Saran

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan pengukuran titer protein Cygb pada respon awal jaringan dan tidak adanya kontrol yang hanya diberikan NAC tanpa perlakuan lain. Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat peran protein Cygb dengan melihat ekspresi gen dan proteinnya dengan interval waktu, sebelum 48 jam setelah intoksikasi CCl<sub>4</sub>. Sehingga terlihat grafik ekspresinya agar tidak salah interpretasi jika hanya mengambil pada satu waktu saja, karena kemungkinan ekspresinya tidak linier, melainkan berbentuk parabola.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapkan terima kasih kepada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler tempat dilakukannya penelitian ini, Kementerian Kesehatan RI atas bantuan biaya penelitian, Dr. H. Gunawan Subrata, MBA atas pemberian NAC (Hidonac®) yang digunakan dalam penelitian ini dan kepada Lindi Haritsah atas kerja sama dalam perlakuan terhadap hewan coba.

## Daftar Rujukan

1. Geuens E, Brouns I, Flamez D, Dewilde S, Timmermans JP, Moens L. A. Globin in the Nucleus. *The Journal Of Biological Chemistry*. 278; 33, Issue of August 15: 30417–30420. [serial online]. 2003. Available in: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/C30020320/DC1> [cited on March, 2009].
2. Singh S, Manda SW, Sikder D, Birrer MJ, Rothermel BA, Garry DJ, Mammen PPA. Calcineurin Activates Cytoglobin Transcription in Hypoxic Myocytes. *JBC Papers in Press*. [serial online]. 2009. Available in: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M809572200> [cited on March, 2009].
3. Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson J C, et al. Cytoglobin is a Respiratory Protein In Connective Tissue And Neurons, Which is Upregulated by Hypoxia. *J Biol. Chem.*[serial online]; 2003. [cited on March, 2009]. 279(9): 8063-8069. Available in: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/M31054020/DC1>
4. Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Green BN, Pesce A, Uzan J, Burmester T, Hankeln Y, Bolognesi M, Moens L, Marden MC. *The Redox State of the Cell Regulates the Ligand Binding Affinity of Human Neuroglobin and Cytoglobin*. *The Journal Of Biological Chemistry, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. Vol. 278, No. 51, p. 51713–51721.
5. Doorslaer SV, Dewilde S, Kiger L, Nistor SV, Goovaerts E, Marden MC, ect. Nitric Oxide Binding Properties of Neuroglobin. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 278, No. 7, Issue of February 14, pp. 4919–4925, 2003. Available in: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/278/7/4919/DC1> [cited on March, 2009].
6. Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber RE. Allosteric Regulation and Temperature Dependence of Oxygen Binding in Human Neuroglobin and Cytoglobin. *The American Society For Biochemistry And Molecular Biology, Inc., The Journal Of Biological Chemistry*. [serial online]. 2004. [cited on March, 2009]; 279, No. 43, Issue Of October 22: 44417–44426.
7. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, etc. Characterization Of A Stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25318–25323.
8. Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Khang SK, et al. Hepatoprotective effects of 18β-glicirrhetic acid on carbon tetrachloride induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacological Research*. 2002; 46(3):221-7.
9. Sadowska AM. Antioxidant and antiinflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effect; A Review. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 20 (2007):9-22.
10. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA. A crucial role for thiol antioxidants in estrogens deficiency bone loss. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 112(6):915-23.
11. Jusman SWA. Analisis ekspresi gen Cygb pada hati tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. Laporan Penelitian Hibah Program Doktor DRPM UI. 2009.
12. Kamalakkannan N, Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Viswanathan P, Menon VP. Protective Effect of N-Acetyl Cysteine in

- Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats.
- ISSN Online: 2151-7525,  
doi:10.5251/abjna.2010.1.6.1126.1132.  
Available in: <http://www.scihub.org/ABJNA>  
[disitasi bulan November 2010].
13. Li D, Chen XQ, Li WJ, Yang YH, Wang JZ, Yu AC. Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress. *Neurochem Res* [serial online]. 2007; 32:1375–80. [disitasi bulan Mei 2009].
  14. Panjaitan RGP, Handharyani E, Chairul, Masriani, Zakiah Z, Manalu W. Pengaruh pemberian karbon tetraklorida terhadap fungsi hati dan ginjal tikus. *Makara, kesehatan*. [serial online]. 2007. [disitasi bulan Mei 2009]; 11. No.1: 11-16.
  15. Dosumu OO, Duru F I O, Osinubi AA, Oremosu AA, Noronha CC. Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2010;
  16. Man KM, Philipsen S, Tan-Un KC. Localization and expression pattern of cytoglobin in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Toxicology Letters. Abstract*. [serial online]. 2008. [disitasi bulan Mei 2009]; Vol 183.Issues1-3: 36-44.
  17. Li D, Chen XQ, Li WJ, Yang YH, Wang JZ, Yu AC. Cytoglobin Up-regulated by Hydrogen Peroxide Plays a Protective Role in Oxidative Stress. *Neurochem Res*. [serial online]. 2007. [disitasi bulan Mei 2009]; 32:1375–1380.
  18. Hodges NJ, Innocent N, Dhanda S, Graham M. Cellular protection from oxidative DNA damage by over-expression of the novel globin cytoglobin in vitro. *Mutagenesis*. 2008; 23(4):293–8.