

KONFIRMASI SPESIFITAS GAD₆₅ TERHADAP ANTI-GAD₆₅ PADA TIKUS DM DAN PASIEN DM TIPE 1

Aulanni'am*, Djoko Wahono Soeatmadji** and Sutiman B Sumitro***

*Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Brawijaya University

**School of Medicine, Brawijaya University

***Laboratory of Molecular Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Brawijaya University
aulani@brawijaya.ac.id

ABSTRACT

The use of glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅) from bovine brain has been studied to obtain basic knowledge and diagnosis and prediction of Type 1 Diabetes Mellitus (DM) patients. The importance of GAD₆₅ in DM diagnosis based on its pathogenesis. One of the autoimmune marker that can be used to detect beta-pancreas destruction in Diabetes Type I is the antibody to glutamic acid decarboxylase (GAD₆₅). Most of the pre-diabetic patients indicate the reactive autoantibody to GAD₆₅. For early detection of anti-GAD₆₅ in the serum of the patient, human recombinant GAD₆₅ has been succeeded to be used. However this is not economical, therefore, it is necessary to find the alternative source of cheaper GAD₆₅. The aim of this research is to develop an early detection kit of Type 1 DM based on antibody-GAD₆₅, since the longest patient suffering from DM has higher probability to be complicated, especially for uncured patients. The anti-GAD₆₅ antibodies induced by anti-GAD₆₅ synthesized and labelled by alkaline phosphatase can be used as reagent detection early DM patients. The ten patients of DM as samples (positive of anti-GAD₆₅) and five rats of DM were positive with western blott technique using reagents as result of this research. It can be concluded, GAD₆₅ enzyme isolated from bovine brain induced anti-GAD₆₅ production and have possibilities to be packaged in a diagnostic kit for patient pre DM.

Key words: DM Type 1, antibody to GAD₆₅

PENGANTAR

Mekanisme jalannya penyakit Diabetes Mellitus (DM), WHO membedakan menjadi 5, yaitu: *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM) atau tipe 1, *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM) atau tipe 2, dan tipe lainnya seperti *Malnutrition Related Diabetes mellitus* (MRDM), *Gestational Diabetes Mellitus* (GDM) (Expert committee, 2000).

IDDM atau diabetes tipe 1 biasanya terjadi pada masa anak-anak dan termanifestasi pada saat dewasa. Tipe ini dicirikan dengan adanya kerusakan sebagian besar sel beta pankreas sampai sekitar 85–90% sehingga terjadi defisiensi insulin yang absolut. Kerusakan sel beta pankreas disebabkan oleh adanya reaksi autoimun terhadap sel beta pankreas namun pada beberapa kasus masih belum diketahui sebabnya (*Idiopathic diabetes*) (Expert committee, 2000). Reaksi autoimun ini dapat disebabkan oleh adanya kerentanan genetik terutama gen HLA-DR, infeksi virus dan paparan toksin (Palmer, 1996). Pada serum darah penderita IDDM yang disebabkan oleh autoimunitas dapat ditemukan adanya beberapa antibodi yang dapat dijadikan *marker* serologis, antara lain: *Inset Cell Antibodies* (ICA), *Insulin Auto-Antibodies* (IAA) dan *Anti-Glutamic Acid Decarboxylase* (anti-GAD₆₅).

Walaupun ICA dan IAA dapat bertindak sebagai marker IDDM autoimun namun sensitivitas dan spesifisitas antibodi tersebut masih kurang jika dibandingkan dengan anti-GAD₆₅. Menurut Palmer, (1996) anti-GAD₆₅ merupakan *marker* serologis utama untuk mendeteksi reaksi autoimun dalam IDDM karena stabilitas *level* konsentrasinya dapat bertahan lama. Anti-GAD₆₅ dapat ditemukan 10 tahun sebelum timbul gejala klinis diabetes (Palmer, 1996). Level anti-GAD₆₅ sedikit berubah selama 3 tahun pertama munculnya gejala penyakit namun masih dapat terdeteksi selama 40 tahun setelah diagnosis (Palmer, 1996).

Pada penderita NIDDM massa sel beta berkurang namun tidak sebesar IDDM, yaitu tinggal 50–70% sehingga masih mampu mensekresi sejumlah insulin ke dalam sirkulasi darah namun dalam kondisi relatif defisiensi (Expert committee, 2000). NIDDM biasanya terjadi pada pasien dewasa. Tipe diabetes ini dapat pula berkembang menjadi ketergantungan insulin (IDDM) dalam beberapa bulan atau tahun setelah diagnosis sehingga disebut sebagai tipe 1½ (Zimmet, 1994).

Fenomena di atas mendukung diadakannya diagnosis dini pasien DM pada fase *pre-disease* untuk mengetahui progresivitas ke arah timbulnya destruksi sel beta pankreas dan melakukan tindakan pencegahan. Diagnosis dini ini lebih difokuskan untuk mendeteksi keberadaan anti-GAD₆₅ mengingat spesifikasi dan sensitivitasnya yang paling baik

(82% dan 100%) dibandingkan *marker* serologis lainnya (Palmer, 1996). Oleh karena itu saat ini mulai dikembangkan penggunaan GAD sebagai faktor alternatif untuk prediksi dini adanya kerusakan sel beta pankreas.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler, FMIPA Unibraw dan Laboratorium Biomedik FK Unibraw. Serum pasien DM diperoleh dari Laboratorium PRODIA, yang dikoleksi pada beberapa laboratorium se Indonesia yang telah diuji positif dengan gold standar kit komersial *human GAD₆₅ recombinant*.

Sampel penelitian berupa, enzim GAD₆₅, serum Tikus (kontrol dan yang dibuat DM melalui paparan *Streptozotocin* 50 mg/kgBB), serum kelinci (kontrol dan hasil immunisasi dengan GAD₆₅), serum penderita dengan anti-GAD₆₅ positif dari laboratorium Klinik PRODIA (Malang) dan serum manusia normal.

Semua bahan yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis (p.a.) kecuali disebutkan lain. Bahan-bahan tersebut adalah: *Aminoetilisothiorium bromida* (AET), *fenilmetilsulfonilflourida* (PMSF), *natrium etilenadiaminat-traasetat* (NaEDTA), pirodoksal fosfat (PLP), sukrosa (C₁₂H₂₂O₁₁), Natrium dihidrogen pospat monohidrat (NaH₂PO₄·H₂O), dinatrium hidrogen pospat (Na₂HPO₄), N,N-dimetil formamid (DMF), gliserol, natrium hidroksida (NaOH), asam klorida (HCl), (NH₄)₂SO₄, BaCl₂, Tri-Cl, Tris-base, Tween 20, Poliakrilamid, Bis-acrylamid, Comassie-blue R-250, Sephadex-G75, Buffer Tris-glisin, Protein marker, Freund adjuvant, Pottasium karbonat, NaIO₄, H₂O₂, Western blue substrat, Diamino Benzidine (DAB), anti-Rat IgG-AP konjugat, anti-Human IgG-AP konjugat, anti-rabbit IgG-AP konjugat, Streptozotocin, alkalin fosfatase, Membran PVDF dan Nitrocellulose (NC), akuabides dan akuades.

Adapun peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah selain peralatan gelas adalah stirer, sentrifuse merk *Jouan MR 1822*, tabung sentrifuse, neraca analitik merk Sartorius tipe PE-620, pH meter merk *Schoot-Gerate* tipe CG 820, mortar, Autocolve, Mini Protean Biorad elektrophoresis, Biorad-semi Dry Transfer Blotting, Dot-Blotter, micropipet, tip micropipet dan kolom kromatografi dan tabung dialisis.

Isolasi GAD₆₅ dan Imunisasi Hewan Coba

GAD₆₅ diisolasi dari otak sapi dan dilanjutkan SDS-PAGE dan elektroelusi untuk mendapatkan pita protein 65 kDa. (Robby dan White, 1987).

Kelinci jantan galur lokal yang diperoleh dari Peternakan Kelinci di Batu Malang, setelah diaklimatisasi dikelompokkan menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan diimunisasi pertama kali dengan 150 µL (250 µg GAD₆₅) dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) perbandingan 1 : 1. Selanjutnya dilakukan booster dengan 150 µL (250 µg GAD₆₅) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) perbandingan 1 : 1. Sedangkan kelompok kontrol diperlakukan sama namun tanpa GAD₆₅. Dan selanjutnya satu minggu setelah booster dilakukan pengambilan darah setiap minggu untuk mendapatkan anti-GAD₆₅.

Pengambilan darah dilakukan melalui vena *auricularis* (*Oryctolagus cuniculus*) menggunakan *disposable spuite* pada waktu yang telah ditentukan (yaitu setiap minggu setelah booster), kemudian dilakukan isolasi imunoglobulin G (IgG) dengan metode pengendapan amonium sulfat jenuh (SAS 50%), dilanjutkan proses dialisis dalam buffer fosfat (Goers, 1993).

Konfirmasi Spesifitas GAD₆₅ dengan Anti-GAD₆₅ melalui Western Blot.

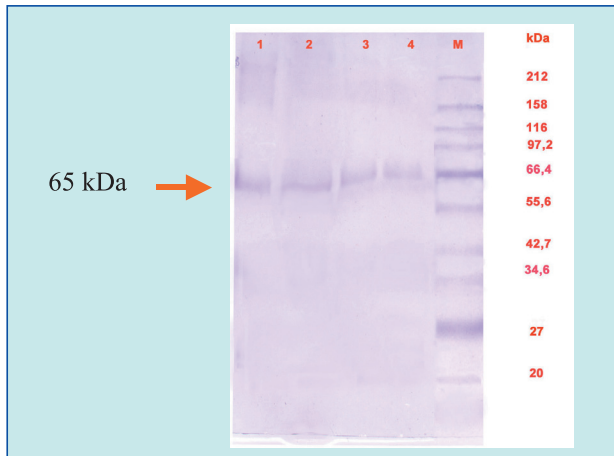
Uji spesivitas antara GAD₆₅ dengan anti-GA₆₅ dilakukan dengan teknik Western blot yang bertujuan melakukan konfirmasi bahwa reaksi yang positif dengan dot blot adalah hasil reaksi antara GAD₆₅ dengan antibodi hasil induksinya, dengan cara sebagai berikut: Isolat GAD₆₅ dilakukan running SDS-PAGE 12% dan selanjutnya ditransfer pada membran PVDF yang terpasang dalam alat *semi dry transfer blotter*, selanjutnya direaksikan dengan anti-GAD₆₅ dan anti-Rat(Rabbit)-IgG-AP dan diberikan substrat western blue (Aulanni'am, 2005).

Isolasi enzim GAD₆₅ diperoleh dari otak sapi melalui metode elektroelusi pita 65 kDa hasil SDS-PAGE. Uji aktivitas GAD₆₅ didahului dengan penentuan kondisi optimum reaksi enzimatik. Sintesis anti-GAD₆₅ dilakukan pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*). Tikus DM disiapkan melalui injeksi Streptozotocin dosis 50 mg/kgBB. Konfirmasi spesifitas anti-GAD₆₅ dan terhadap GAD₆₅ dilakukan dengan teknik western blot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat GAD₆₅ yang diperoleh dari jaringan otak sapi dikarakterisasi berat molekulnya dengan teknik SDS-PAGE seperti pada Gambar 1. GAD₆₅ murni hasil isolasi ini selanjutnya dilakukan karakterisasi melalui pengujian aktivitasnya menggunakan substrat asam glutamat. Kondisi optimum rekasi GAD₆₅ dihasilkan pada pH 7,0; suhu 37 °C

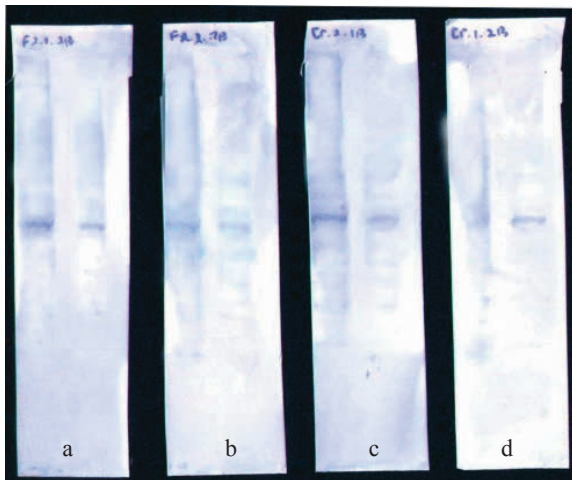
dan waktu inkubasi 15 menit dengan aktivitas sebesar 2,4653 unit.



Gambar 1. Hasil elektroforegram GAD₆₅ dengan SDS-PAGE 12%
Keterangan: lane 1, 2, 3, 4: sample isolat GAD₆₅ M: marker protein.

Biosintesis Anti-GAD₆₅

Hasil isolat enzim GAD₆₅ yaitu merupakan molekul protein dengan berat 65 kDa dipakai sebagai antigen atau bahan induksi biosintesis anti-GAD₆₅ pada kelompok hewan coba (*Oryctolagus cuniculus*) untuk dapat memproduksi anti-GAD₆₅. Kemampuan GAD₆₅ dalam menginduksi biosintesis anti-GAD₆₅ dikonfirmasi dengan teknik western blot (Gambar 2).



Gambar 2. Spesifitas GAD₆₅ dengan anti-GAD₆₅ hasil induksinya pada kelinci.

Keterangan: a–b: GAD₆₅ hasil pemurnian c–d: crude GAD

Hasil analisis dengan Western Blot menunjukkan bahwa anti-GAD₆₅ yang diinduksi cukup sensitif untuk mengenali

peptida-peptida enzim GAD₆₅ dengan BM 65 kDa yang diketahui sebagai marker utama dalam IDDM (Gambar 2). Hasil dari *Western Blotting* (Gambar 2) tampak pita yang diduga sebagai antibodi 65 kDa. Pita protein yang muncul pada kelompok tikus yang dikenai perlakuan dengan induksi anti-GAD₆₅, dengan pola ketebalan yang berbeda, yaitu tergantung kualitas dari bahan induksinya (lama induksi). Keadaan ini diduga juga karena perbedaan kekuatan dari ikatan antibodi dengan *antibodi conjugate* pada kelompok hewan coba.

Dari hasil uji silang pada tikus DM dan penderita DM dengan anti-GAD₆₅ positif, peptida-peptida ini juga dikenali oleh antibodi penderita DM (anti-GAD₆₅ positif) dan tikus DM. Hal ini menunjukkan adanya kesamaan respon antara anti-GAD₆₅ yang disintesis oleh tikus normal yang diinduksi enzim GAD₆₅ dengan anti-GAD₆₅ peptida DM (anti-GAD positif) dan tikus DM. Hal ini dapat dinyatakan bahwa enzim GAD₆₅ dapat dikenali anti-GAD₆₅ dari Tikus DM, pasien DM tipe 1 dan Tikus serta kelinci yang terpapar GAD₆₅.

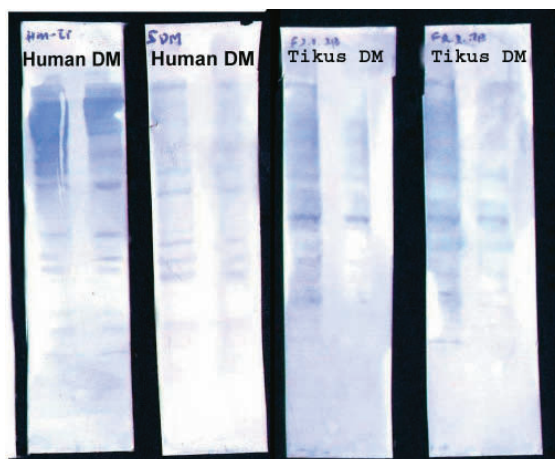
Tabel 1. Konsentrasi gula darah Tikus setelah penyuntikan Streptozotocin 50 mg/kgBB

Tikus	Kadar gula darah setelah penyuntikan streptozotocin (mg/dl)	
	4 hari	8 minggu
1	325	385
2	315	360
3	345	400
4	455	552
5	550	625

Adapun Hewan coba DM yang dipakai dalam penelitian ini dipersiapkan dengan pemaparan oleh *Streptozotocin* dosis 50 mg/kg berat badan. Hasil eksplorasi dosis *streptozotocin* menunjukkan kadar gula darah tikus > 300 mg/dl, kadar ini sesuai dengan persyaratan tikus DM. Adapun data kadar gula darah dari tikus setelah pemberian *streptozotocin* 50 mg/kg berat badan (Tabel 1).

Hasil *western blot* menggunakan serum pasien (anti-GAD₆₅ positif) didapatkan reaksi yang positif (Gambar 3). Serum penderita anti-GAD₆₅ positif diperoleh dari “laboratorium Prodia” yang sudah dilakukan uji dengan ELISA menggunakan kit “human recombinant GAD₆₅” yang diproduksi oleh *Boehringer-German*. Serum-serum tersebut mempunyai titer sebesar 1.05–2.770. Gambar 3, hasil uji enzim GAD₆₅ terhadap serum penderita anti-GAD₆₅ positif dengan uji *western blot*, menunjukkan hasil yang positif, hal ini menandakan bahwa enzim GAD₆₅ yang diisolasi dari otak sapi dapat dikenali oleh autoanti-GAD₆₅ manusia maupun tikus DM. Enzim GAD₆₅ mampu menginduksi biosintesis anti-GAD₆₅ dan telah diuji

spesifitasnya dengan teknik *western blot* pada hewan coba dan pasien DM, seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Spesifitas GAD₆₅ dengan anti-GAD dari serum hewan Coba DM dan pasien DM.

Hasil penelitian (Gambar 3) menunjukkan bahwa anti-GAD₆₅ yang ditemukan pada hewan coba DM dan pasien DM dikenali oleh isolat GAD₆₅. Anti-GAD₆₅ hasil sintesis yang dilabel *alkaline phosphatase* selanjutnya dapat dipakai untuk deteksi keberadaan anti-GAD₆₅ dengan teknik *western blot* terhadap serum hewan coba DM dan pasien DM yang telah diidentifikasi positif dengan ELISA menggunakan *human recombinant GAD₆₅*.

Beberapa laporan menuliskan bahwa sekitar 80% pasien DM tipe 1 mempunyai antibodi yang mengenali antigen 65 kDa, dan antibodi ini merupakan marker khusus untuk prediksi kejadian DM tipe 1.

Untuk mendapatkan kualitas anti-GAD₆₅ yang lebih baik saat ini sedang dilakukan penelitian untuk produksi anti-GAD₆₅ dan anti-GAD₆₅ pada sel hibridoma. Sel hibridoma yang disiapkan adalah hibridoma dari sel limfoblas menci yang diimunisasi dengan anti-GAD₆₅ dengan sel myeloma.

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. enzim GAD₆₅ mampu menginduksi anti-GAD₆₅ pada tikus (*Rattus norvegicus*).
2. spesifitas GAD₆₅ dan anti-GAD₆₅ diuji dengan teknik *Western Blott* terhadap serum hewan coba DM dan pasien DM tipe 1.
3. GAD₆₅ hasil isolasi dari otak sapi dapat dikembangkan sebagai calon kit deteksi dini pasien pre-DM.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Kantor Menristek yang telah mendanai penelitian ini dalam proyek RUT XIII tahun 2005.

KEPUSTAKAAN

- Aulanni'am, 2005. Protein dan Teknik Analisisnya. Citra Mentari Group, Malang. pp: 67–74; 88–89.
- Goers J, 1993. Immunochemical Technique Laboratory Manual, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publisher, Sidney.
- Palmer, 1996. What is the best way in predict IDDM *The Lancet*, 343: 1337–1378.
- Robyt JF dan White BJ. Biochemical Techniques: Theory and Practice, 1987, pp. 116–118, 129–150, 292–318.
- The Expert Committee, 2000. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 23 (Suppl.1): S4–S19.
- Tinamaija T, Merrill JR, William K, Qiao-Yi Chen, Tamara M, Zimmet P, dan Ian RN, 1994. Autoantigenic Properties of Native and Denatured Glutamic Acid Decarboxylase: Evidence for a Conformational Epitope. *Clinical Immunology and Immunopathology* 71: 53–59.
- Zimmet P, 1994. Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults (LADA): The Role of Antibodies to Glutamic Decarboxylase in Diagnosis and Prediction of Insulin Dependency. *Diabetes Medicine*, 11: 229–303.

Reviewer: **Drs. Win Darmanto, MSi., PhD.**

EKSPRESI NEUROFILAMEN DAN NCAM SECARA *WHOLE-MOUNT* IMMUNOHISTOKIMIA PADA EMBRIO MENCIT AKIBAT INDUKSI 2-METHOXYETHANOL

Win Darmanto

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga

ABSTRACT

Induction of 2-ME to mouse embryo causes some abnormal limb, vertebrae and brain development such as syndactily, polydactily, malformation of vertebrae and exencephaly. (Darmanto et al., 1994a, Darmanto 1998), however, the exact mechanism of such abnormal development has not been clarified yet. Since neurofilament and neural cell adhesion molecule (NCAM) has been reported to have a pivotal role for embryo development, we hypothesized that expression of neurofilament and NCAM changes by 2-ME, altering neurofilament and NCAM function. Under these background we studied changes in the expression of neurofilament and NCAM in the limb bud, body of fetus and head of mice fetus by induction of 2-ME. Pregnant Slc: ICR mice were injected intraperitoneally to 10 mmol/kg of 2-ME on gestation day 9. Embryo were obtained on gestation day 12. Immunohistochemistry using neurofilament and NCAM antibody were observed. Neurofilament and NCAM was constantly expressed in whole body especially on limb bud, in the mesenchym around the vertebrae, and in the mice head embryo during the course of brain development. By prenatal injection of 2-ME, the expression of NCAM in the limb bud of embryo that was assume to be malformed development, seemed to be changes in pattern of expression, the development of NCAM was not spread completely. In the control expression of NCAM were disperse completely in the tissue. In the head and the myotome around of vertebrae that was assume to be exencephaly and vertebrae malformation, the expression of neurofilament was also changes in the pattern of expression and tended shorter compare to the control. Our results suggested that injection of 2-ME, in prenatal period especially on gestation day 10, the expression of neurofilament and NCAM tended to decrease and the pattern was changes 2 days after the injection of 2-ME.

Key words: neural adhesion molecule (NCAM), neurofilament, 2-methoxyethanol, mice

PENGANTAR

Proses perkembangan sel otot dari *stem cells* pada masa embrio, khususnya saat pembentukan kuncup anggota, melibatkan beberapa tahap perkembangan. Pertama, *stem cells* calon sel otot mengawali proses perubahan dan perkembangan yang disebut determinasi. Setelah determinasi, prekursor sel otot (mioblast), keluar dari siklus sel, untuk saling bergabung membentuk beberapa mikrotube. Mioblast juga mensintesis beberapa protein struktural maupun enzim yang diperlukan dalam tahap akhir proses diferensiasi untuk menjadi sel otot yang benar dan fungsional (Lyons *et al.*, 1992). Interaksi antarsel dalam rangka membentuk fusi beberapa sel otot untuk menjadi satu sel yang *multinuclear*, adalah tahap yang paling kritis selama proses pembentukan sel otot. Interaksi antarsel dalam proses fusi sel mioblast ini telah dibuktikan diperankan oleh beberapa famili *cell adhesion molecules* (CAMs) (Knudsen, 1990). *Neural adhesion molecules* (NCAM) adalah kelompok CAMs, berupa immunoglobulin yang telah diketahui diekspresi banyak selama perkembangan otot rangka dan juga telah dibuktikan berperan penting dalam fusi sel mioblast (Dickson *et al.*, 1990, Knudsen, 1990). Lyons *et al.*, 1992, menunjukkan bahwa NCAM adalah

sialoglycoprotein pada permukaan sel, menempel pada membran sel. Pembentukan semua otot rangka selama perkembangan embrio terbentuk dari sel asal yaitu somit. Somit terbentuk hasil segmentasi mesoderm paraksial sepanjang *rostrocaudal* membentuk susunan bola-bola sel yang nantinya berkembang menjadi dermatom, miotom dan sklerotom. Miotom terbentuk dari migrasi sel sepanjang permukaan ventral, yang merupakan bentuk otot rangka yang pertama kali yang masih berinti satu yaitu pada masa embrio. Selanjutnya sel otot rangka tersebut berfusi membentuk miotube berinti banyak. Otot pada anggota terbentuk dari turunan sel *premyogenic* yang bermigrasi dari sisi ventrolateral dermamiotom. Semua proses segmentasi somit, migrasi sel, dan fusi sel mioblast ini melibatkan NCAM. Pada embrio mencit NCAM mulai diekspresi pada umur kebuntingan 8 hari (Tomasiewicz *et al.*, 1993). Fushiki *et al.* (1993) menunjukkan gangguan pola ekspresi NCAM pada kultur jaringan kortek cerebrum akibat radiasi sinar gamma cobalt,⁶⁰ diduga sebagai penyebab gangguan migrasi sel neurons. Di sisi lain, senyawa toksik yang mampu merusak matrik sel adhesi telah dibuktikan menghambat proses miogenesis (Knudsen, 1990). Neurofilamen bersama-sama dengan NCAM terekspresi dalam *glial fiber* maupun sel

ganglion dan ikut berperan dalam pemandu transport intraseluler dari badan neuron menuju ke beberapa *axon* dan *dendrit*. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa adanya kegagalan dalam fungsi otot polos longitudinal dan sirkuler pada kasus *stenosis pylorus* diketahui berkaitan dengan tidak terespresinya NCAM dan neurofilament atau menandakan tidak adanya invasi pada jaringan otot polos (Kobayashi *et al.*, 2004). Perkembangan kuncup anggota masa embrio akan terganggu, dengan adanya penurunan ekspresi neurofilament (Nicholas *et al.*, 2003).

2-Methoxyethanol (2-ME) adalah salah satu contoh senyawa *glycol ether* yang merupakan turunan dari senyawa *phthalate ester* (ester ftalat). Senyawa ini banyak digunakan sebagai bahan dasar plastik (*plasticizer*), limbah senyawa ini sering terbuang di lingkungan dan menjadi bahan polutan, khususnya di lingkungan perairan atau sungai (Miller *et al.*, 1983). Senyawa tersebut telah diketahui bersifat toksik maupun teratogenik (penyebab cacat kandungan) pada beberapa spesies mamalia (Feuston *et al.*, 1990, Darmanto, 1998). Laporan sebelumnya juga menyebutkan bahwa, beberapa orang telah keracunan 2-ME melalui penetrasi ke dalam kulit dan saluran pernafasan (Dugard *et al.*, 1984). Sekitar 100.000 orang teracuni 2-ME pertahun, dari jumlah tersebut diduga adalah kaum wanita yang masih dalam masa subur atau mampu melahirkan (Scoot *et al.*, 1989). Sifat teratogenik 2-ME pada hewan percobaan, diduga disebabkan oleh hasil metabolisme 2-ME di dalam sel liver menjadi *methoxyacetic acid* (MAA), oleh bantuan katalisator *alcohol dehydrogenase* (ADH) (Brown *et al.*, 1984, Moslen *et al.*, 1995). MAA juga telah terbukti bersifat embriotoksik dan teratogenik pada mamalia baik embrio preimplantasi maupun postimplantasi, sifat toksik ini sama dengan yang disebabkan oleh 2-ME (Darmanto *et al.*, 1994). Penelitian lain telah membuktikan bahwa 2-ME menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi berupa kerusakan pada jaringan testis, khususnya pada proses spermatogenesis, menyebabkan apoptosis (kematian sel) pada spermatisit tikus, marmut, kelinci (Ku *et al.*, 1995, Wine *et al.*, 1997). 2-ME juga diketahui sangat potensial menyebabkan kelainan perkembangan otak yaitu menyebabkan otak terdedah eksensefali (Ketti *et al.*, 1996). Penelitian kami sebelumnya menyebutkan bahwa, 2-ME menyebabkan kelainan pada fetus mencit yang induknya diberi 2-ME maupun MAA, kelainan yang muncul terutama adalah kelainan rangka anggota, kelainan rangka aksial, sebagai akibat kerusakan jaringan embrional somit yang selanjutnya memunculkan kelainan rangka vertebrae dan tulang rusuk, *medula spinalis* terdedah (*spina bifida*); dan eksensefali (Darmanto *et al.*, 1994, Darmanto, 1998).

Penelitian ini dirancang agar dapat mengungkapkan mekanisme proses munculnya kelainan khususnya kelainan jari, rangka vertebra maupun eksensefali dengan cara mengamati tingkat ekspresi protein neurofilamen dan NCAM pada tunas calon anggota, tubuh embrio dan daerah kepala yang nantinya berkembang eksensefali. Neurofilamen dan NCAM adalah kelompok protein pemandu sel pada saat organogenesis, apabila tingkat ekspresi senyawa ini terganggu oleh senyawa 2-ME, diduga akan ikut berperan dalam memunculkan kelainan yang terjadi pada anggota, vertebra maupun eksensefali. Sebelumnya mekanisme munculnya kelainan anggota akibat 2-ME diduga disebabkan oleh tingginya kematian sel pada kuncup anggota, sehingga jumlah sel mesemkim pada kuncup anggota menurun dan tidak mampu menghasilkan sejumlah sel kuncup anggota yang lengkap sehingga terbentuk sindaktili, ektrodaktili maupun kelainan yang terjadi pada rangka vertebra (Darmanto, 1998). Namun yang terjadi banyak kelainan polidaktili yang muncul, sehingga kematian sel sebagai penyebab munculnya kelainan jari bukan satu-satunya jalur mekanisme. Oleh karena itu penelitian ini, mempelajari gangguan protein yang berperan pada saat masa organogenesis yaitu neurofilamen dan NCAM diharap dapat membantu mengungkapkan munculnya kelainan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Mencit jantan dan betina berasal dari hasil imbrid strain Slc:ICR umur 8 sampai 12 minggu, sebanyak 15 ekor terdiri atas 5 induk mencit kontrol dan 10 induk mencit perlakuan, ditempatkan dalam kandang terbuat dari *stainless steel* diletakkan dalam rumah hewan dengan kondisi ber-AC, temperatur (21 ± 1 °C), kelembapan relatif ($50 \pm 10\%$) dan jadwal perubahan gelap/terang selama 12 jam. Mencit diberi makanan standart (CE-2, diperoleh dari CLEA Japan).

Cara Kerja

Mencit betina bunting umur kebuntingan 9 hari (ditemukan *vaginal plug* = umur kebuntingan 0 hari) pukul 8.00 diinjeksi *2-methoxyethanol* (2-ME) secara intraperitoneal dengan dosis 10 mmol/kg BB. Pada umur kebuntingan 12 hari (3 hari setelah diberi 2-ME), mencit dikorbankan dan dibedah untuk diambil embrionya, sebagian dikorbankan pada umur kebuntingan 18 hari untuk mengamati tingkat kelainan eksternal yang terjadi. Embrio umur kebuntingan 12 hari selanjutnya dilakukan pemeriksaan *immunohistokimia* dengan metode *whole-mount immunohistochemistry* terhadap neurofilamen dan NCAM

(Davis 1993), sedangkan embrio umur kebuntingan 18 hari diidentifikasi kelainan yang terjadi.

Pewarnaan Imunohistokimia

Tahapan prosedur pengamatan ekspresi neurofilamen dan NCAM dengan Imunohistokimia berturut-turut melalui tahapan berikut ini.

Embrio diambil, dimasukkan dalam *phosphate buffer saline (PBS) Dulbecco's*, kemudian difiksasi dalam campuran *methanol: dimethyl sulfoxide (DMSO)* perbandingan 4:1, selama semalam pada suhu 4 °C atau *paraformaldehyde (PFA)* 4% dengan perbandingan 20 ml untuk sekitar 7 embrio. Setelah difiksasi embrio didehidrasi dengan jalan diletakkan dalam: (1) PBS: metanol (75:25) selama 20 menit, (2) PBS: metanol (50:50) selama 20 menit, (3) PBS: metanol (25:75) selama 20 menit, (4) metanol 100% selama 20 menit (atau disimpan dalam waktu lama dalam suhu -20 °C). Selanjutnya embrio dimasukkan dalam metanol: 30% H₂O₂ (5:1) pada temperatur kamar selama 5–10 jam. Embrio selanjutnya dilakukan hidrasi dengan cara dimasukkan dalam *phosphate buffer saline triton (PBST)*: metanol (25:75) selama 30 menit, PBST: metanol (50:50) selama 30 menit, PBST: metanol (75:25) selama 30 menit, PBST murni selama 30 menit, dimasukkan dalam PBSBT (ditambahkan bovine serum) selama 1 jam sebanyak 2 kali, dimasukkan dalam antibodi primer (*anti-NCAM* atau *anti-neurofilament*) dengan konsentrasi 1:1000 dalam PBSBT, kemudian embrio dicuci dengan: PBSBT pada suhu 4 °C selama 1 jam 2 kali, PBSBT pada suhu kamar selama 1 jam 3 kali, dimasukkan dalam antibodi sekunder (*anti-antibody-NCAM* atau *anti-antibody neurofilament*) dalam PBSBT pada suhu 4 °C selama 2 × 24 jam (2 malam), berikutnya dicuci dengan: PBSBT pada suhu 4 °C selama 1 jam 2 kali, PBSBT pada suhu kamar selama 1 jam 3 kali, PBSBT pada suhu kamar selama 30 menit, dimasukkan dalam *Diamino Benzidine (DAB)* (0,3 mg/ml DAB dalam PBSBT yang mengandung H₂O₂ 0,03%) pada temperatur kamar selama 20 menit (tergantung besarnya spesimen, dan perlu diamati jangan sampai warna terlalu gelap), untuk spesimen yang kecil hanya diperlukan waktu 10 menit. Setelah warna sudah cukup, segera spesimen dimasukkan dalam PBS dengan tujuan untuk menghentikan pertambahan warna. Selesai pewarnaan, selanjutnya spesimen dicuci dalam: PBST sebanyak 5 kali, PBST: metanol (100:0) selama 30 menit,

PBST: metanol (70:30) selama 30 menit, PBST: metanol (50:50) selama 30 menit, PBST: metanol (20:50) selama 30 menit, metanol murni 30 menit 2 kali. Pada tahap ini bisa disimpan dalam metanol murni temperatur -20 °C dalam jangka lama.

Tahap clearing embrio dengan dimasukkan dalam campuran *benzyl alcohol - benzyl benzoat (BABB)*: metanol (1:1) selama 30 menit, BABB murni 30 menit selama 2 kali, BABB: metanol (1:2).

HASIL

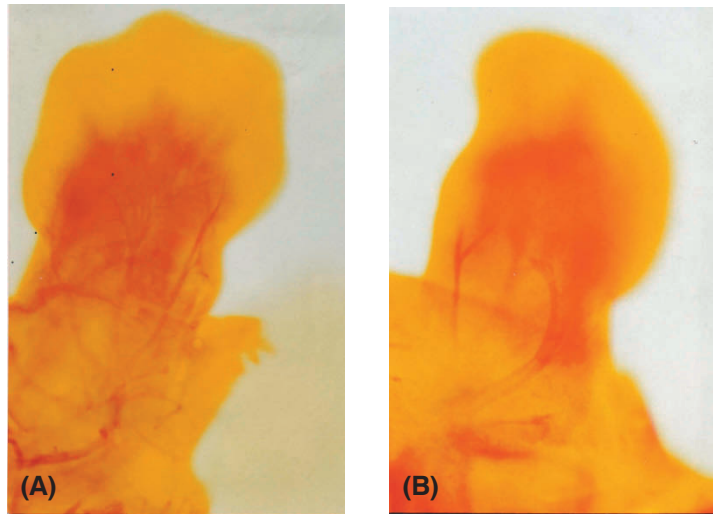
Kelainan eksternal banyak muncul akibat 2-ME yang diinjeksi secara intraperitoneal dosis 10 mmol/kg BB, meliputi kelainan jari, rangka vertebrae, eksensefali seperti terlihat pada gambar 1. Kelainan ektradaktili yang muncul dapat berupa hilangnya sebagian atau seluruh jari, sedangkan sindaktili dapat berupa sindaktili jaringan lunak atau sampai sindaktili tulang. Kelainan polidaktili dapat berupa polidaktili sebagian jari atau polidaktili sempurna.

Untuk mempelajari mekanisme proses kelainan pada jari, kelainan rangka vertebrae maupun eksensefali, selanjutnya proses perkembangan neurofilamen dan NCAM pada daerah yang diduga akan berkembang menjadi kelainan yang seperti gambar 1, diamati secara imunohistokimia dengan *antineurofilament* dan *antiNCAM*.

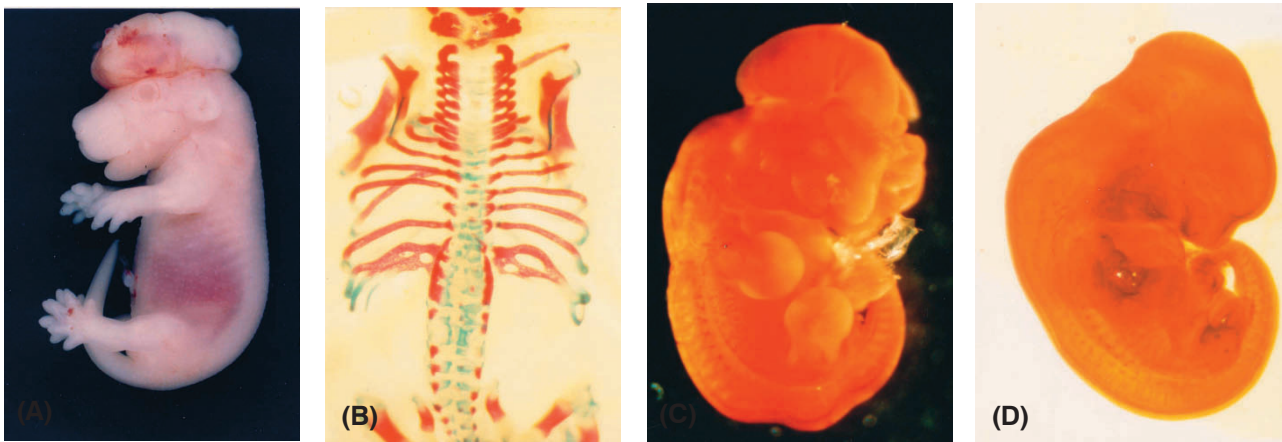
Pengamatan terhadap tingkat ekspresi protein neurofilamen yang diamati dengan pewarnaan secara *whole mount* imunohistokimia dengan menggunakan antibodi neurofilamen terhadap kuncup anggota umur kebuntingan 12 hari, yaitu 3 hari setelah pemberian 2-ME secara intraperitoneal pada induknya terlihat adanya perkembangan percabangan *neurofilamen* yang terhambat namun terlihat lebih tebal, sedangkan pada kontrol percabangan ekspresi neurofilamen tersebut terlihat pola lebih merata dan panjang, seperti terlihat pada Gambar 2. Ekspresi NCAM juga menunjukkan pola yang sama bila dibandingkan pola pada ekspresi neurofilamen. Ekspresi NCAM pada daerah embrio yang diduga akan berkembang menjadi kelainan terlihat pola ekspresi NCAM terhambat. Pada daerah calon spinabifida terlihat ekspresi NCAM menunjukkan ekspresi NCAM yang tidak lengkap, begitu juga pada daerah calon otak yang mengalami eksensefali ekspresi NCAM tidak begitu nampak jelas.



Gambar 1. Kelainan pada jari akibut 2-ME dosis 10 mmol/kgBB yang diamati pada umur kehamilan 18 hari, (A) kontrol, (B) Olidaktili/ektrodaktili, (C) sindaktili/brakidaktili, dan (D) polidaktili sempurna.



Gambar 2. Pengamatan secara immunohistokimia terhadap neurofilamen dan NCAM pada embrio umur kebuntingan 12 hari yang telah diinduksi 2-ME pada umur kebuntingan 9 hari dosis 10 mmol/kg BB. (a) ekspresi neurofilamen terlihat membentuk juluran panjang pada kuncup anggota kontrol, (b) ekspresi neurofilamen kuncup anggota perlakuan membentuk juluran pendek dan lebih tebal dengan bentuk kuncup anggota lebih dan tidak normal.



Gambar 3. Kelainan eksternal pada otak dan vertebrae akibat 2-ME dosis 10 mmol/Kg BB yang diamati pada umur kehamilan 18 hari, (A) Otak terdedah (eksensefali), (B) Spina bifida terlihat adanya vertebrae yang membelah, (C) Pewarnaan terhadap NCAM pada fetus kontrol, dan (D) Ekspresi NCAM terlihat adanya kelainan pada daerah yang diduga nantinya berkembang menjadi eksensefali maupun spina bifida.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa 2-ME secara jelas menyebabkan beberapa kelainan eksternal, walaupun juga ditunjukkan adanya pola ekspresi neurofilamen maupun NCAM yang menyimpang akibat 2-ME namun masih belum bisa dipastikan apakah ekspresi neurofilamen dan NCAM sebagai satu-satunya faktor yang menyebabkan kelainan perkembangan yang mengarah pada kelainan, masih belum bisa dibuktikan.

Hal ini ada dugaan kematian sel yang terjadi pada jaringan embrio ada kemungkinan akan menyebabkan hambatan ekspresi neurofilamen dan NCAM, sehingga masih perlu bukti tambahan untuk menguatkan bahwa ekspresi neurofilamen dan NCAM berperan dalam munculnya kelainan embrio. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa neurofilamen dan NCAM merupakan protein yang vital untuk perkembangan organ, khususnya perkembangan anggota (Nicolas *et al.*, 2003). Pada

perkembangan otak juga telah dibuktikan, apabila terjadi penyimpangan ekspresi NCAM akan menyebabkan kelainan yaitu gangguan migrasi sel neuron di daerah neokortek, yang nantinya dapat memunculkan kelainan perkembangan otak, seperti munculnya mikrosefali (Fushiki *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 1996). Dari hasil penelitian ini sekalipun masih sedikit fakta dan awal, namun dapat disimpulkan bahwa 2-ME menyebabkan kelainan eksternal dan gangguan pola ekspresi protein neurofilamen dan NCAM baik pada kuncup anggota, pada daerah somit maupun daerah kepala.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian dikerjakan di laboratorium Teratologi dan Genetik, *Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University*, Japan, dengan biaya dari Monbukagakusho dan JSPS Japan. Oleh karena itu dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada para pembimbing kami yaitu: Prof. Dr. Yoshiharu Murata dan Minoru Inouye, Ph.D. yang telah memberi kesempatan dan bimbingan dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Brown NA, Holt D, and Web M, 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxicology Letters*, 22: 93–100.
- Darmanto W, 1998. Efek 2-methoxyethanol terhadap pembentukan somite dan kelainan rangka aksial pada mencit. *Proceeding Temu Ilmiah VII*, Hiroshima, Japan: 19–22.
- Darmanto W, Sudarwati S, and Sutasurya LA, 1994. Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environmental Medicine* 38: 25–28.
- Davis CA, 1993. Whole-Mount immunohistochemistry. Method in enzymology, 225: 502–515.
- Dickson G, Perk D, Moore SE, Barton CH, and Walsh FS, 1990. Enhance in myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblast. *Nature (London)* 344: 348–351.
- Dugard PH, Walker M, Mawdsley SJ, and Scott RC, 1984. Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environmental Health Perspective*, 57: 193–197.
- Feuston MH, Kerstetter SL, and Wilson PD, 1990. Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundamental Applied Toxicology*, 15: 448–456.
- Fushiki S, Matsushita K and Schull WJ, 1996. In utero exposure to low-doses of ionizing radiation decelerates neuronal migration in the developing rat brain. *International Journal Radiation Biology*, 70: 53–60.
- Fushiki S, Matsushita K, and Schull WJ, 1993. Decelerated migration of neocortical neurones in explant culture after exposure to radiation. *Developmental Neuroscience*. 5: 353–356.
- Ketti KT, Donald BS, Stedman BB, and Welch F, 1996. Effects of 2-methoxyethanol on mouse neurulation. *Teratology*, 54: 219–229.
- Knudsen KA, 1990. Cell adhesion molecule in myogenesis. *Current Opinion Cell Biology*, 2: 901–906.
- Kobayashi H, O'Brain DS, dan Puri P, 2004. Immunohistochemical characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM), nitric oxide synthetase, and neurofilament protein expression in pyrolic muscle of patients with pyrolic stenosis. *The National Academy of Sciences of the USA*.
- Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BL, and Chapin RE, 1995. Spermatocyte Toxicity of 2-Methoxyethanol (ME) in Rats and Guinea Pigs: Evidence for the Induction of Apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134: 100–110.
- Lyons GE, Moore R, Yahara O, Buckingham ME, dan Wals FS, 1992. Expression of NCAM during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *Developmental dynamics*, 194: 94–104.
- Miller RR, Hermann EA, Langvardt PW, McKenna J, and Schwetz BA, 1983. Comparative Metabolism and Disposition of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and Propylene Glycol Monomethyl Ether in Male Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 67: 229–237.
- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, William WA, 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*, 96: 217–224.
- Nicolas MA, Cai L, dan Brown DD, 2003. Thyroid hormone controls the developments between the spinal cord and limbs during *Xenopus laevis* metamorphosis. *The National Academy of Sciences of the USA*.
- Scott WJ, Fradkin R, Wittfoht W, and Nau H, 1989. Teratologic Potential of 2-Methoxyethanol and Transplacental Distribution of its Metabolite, 2-Methoxyacetic Acid, in Non-Human Primates. *Teratology*, 39: 363–373.
- Sun X-Z, M Inouye, Y Takagishi, S Hayasaka, and Yamamura H, 1996. Follow-up study on histogenesis of microcephaly associated with ectopic gray matter induced by prenatal g-irradiation in the mouse. *Journal Neuropathology and Experimental Neurology*, 55: 357–365.
- Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, dan Goridis C, 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (NCAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron*, 11: 1163–1174.
- Wine RN, Ku WW, Li LH, and Chapin RE, 1997. Cyclophilin is a present in rat germ cells and is associated with spermatocyte apoptosis. *Biology Reproduction*, 56: 493–446.

Reviewer: **Tim Reviewer**

**Seminar Biologi Nasional tahun 2005
Surabaya**