

2,3,7,8-TETRAKLORODIBENZO-*P*-DIOKsin (TCDD) MEMACU AKTIVITAS BIOSINTESIS PROTEIN DI JARINGAN PALATUM EMBRIO MENCIT

Salomo Hutahaean¹, S.Mangkoewidjojo², M.Sagi³, W. Asmara²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

³Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Abstrak

Bahan pencemar dioksin 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) yang diberikan pada mencit bunting menyebabkan janin yang dihasilkan menderita cacat *cleft palate*, dengan ciri bilah palatum kerdil atau bilah palatum tumbuh pendek. Telah dilakukan penelitian untuk menguji apakah pengurangan biosintesis protein terlibat sebagai mekanisme yang mendasari hambatan pertumbuhan bilah palatum oleh TCDD. Delapan ekor mencit bunting dibagi ke dalam empat kelompok, masing-masing diberi TCDD dosis 0, 5, 10, atau 20 µg/kg berat badan pada hari ke-12 kebuntingan. Besaran aktivitas biosintesis protein jaringan palatum embrio ditentukan dengan teknik AgNOR pada sediaan histologis irisan jaringan kraniofasial embrio usia kebuntingan hari ke-15. *Nucleolar Organizing Region* (NOR) adalah tempat biogenesis ribosom di inti sel yang jumlahnya meningkat seiring dengan peningkatan aktivitas biosintesis protein sel. Rataan jumlah butir AgNOR sel-sel jaringan palatum yang terendah adalah 2,51±0,167 untuk perlakuan 0 µg/kg bb (kontrol), dan berturut-turut 2,87±0,146, 2,87±0,190, dan 2,88±0,160 untuk perlakuan dosis 5, 10, dan 20 µg/kg bb. Jumlah butir AgNOR pada seluruh kelompok yang diberi TCDD lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah butir AgNOR pada kontrol ($P < 0,05$). Disimpulkan, pengurangan biosintesis protein bukanlah mekanisme yang mendasari hambatan pertumbuhan palatum mencit oleh TCDD. Diduga, peningkatan biosintesis protein oleh TCDD menimbulkan kekacauan keseimbangan protein-protein faktor tumbuh di jaringan palatum dan mengakibatkan gangguan pertumbuhan dan diferensiasi.

Kata kunci: *cleft palate*, palatogenesis, TCDD

PENDAHULUAN

Dioksin adalah nama umum untuk sekelompok senyawa pencemar penting yang termasuk dalam golongan bahan pencemar organik yang sulit teruraikan (*Persistent Organic Pollutants* / POPs). Terdapat 75 macam senyawa *polychlorinated dibenzo-p-dioxin* (PCDD) yang termasuk ke dalam kelompok dioksin. Oleh karena sifatnya yang toksik, persisten, bioakumulatif, dan *mobile* di lingkungan, badan dunia di bawah PBB, *United Nation Environmental Programme* (UNEP), giat mengkampanyekan masalah pencemaran dioksin agar menjadi perhatian global (Anonimus, 1999).

Dioksin adalah senyawa paling toksik yang pernah dihasilkan oleh kegiatan manusia (Birnbaum, 1995). Cakupan ketoksikannya sangat luas, meliputi reprotoksik, neurotoksik, hepatotoksik, dan imunotoksik. Dioksin juga bersifat karsinogenik dan teratogenik (Birnbaum, 1995). Jenis dioksin yang paling tinggi aktivitas ketoksikannya adalah 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD). Oleh karena itu, TCDD digunakan sebagai senyawa prototipe dioksin dan paling banyak diteliti dibandingkan dengan jenis senyawa-senyawa dioksin lainnya (Kimbrough, 1998; Safe, 1998).

Gangguan perkembangan embrio oleh dioksin pada hewan-hewan percobaan muncul pada tingkat dosis yang sangat rendah, jauh lebih rendah daripada tingkat dosis yang diperlukan untuk memunculkan efek ketoksikan jenis lainnya (Fiedler, 2000). Pada embrio mamalia telah dikenali dua macam kelainan perkembangan yang dihasilkan dioksin yaitu kelainan di ginjal (*hidronefrosis*) dan cacat langit-langit mulut bercelah (*cleft palate*) (Birnbaum, 1995). Dalam percobaan di laboratorium, TCDD adalah senyawa penginduksi cacat bawa lahir *cleft palate* yang paling kuat pada hewan mencit (Lilienfield dan Gallo, 1989).

Proses hambatan palatogenesis oleh TCDD belum sepenuhnya diketahui. Informasi itu penting, baik sebagai sumbangan ilmiah tentang proses gangguan pembentukan organ maupun dari segi kegunaan praktis dalam pencegahan cacat *cleft palate*. Saat ini, cacat *cleft palate* termasuk cacat bawaan yang paling kerap muncul di antara seluruh jenis cacat bawa lahir yang dikenal, dengan angka insidensi pada penduduk dunia, biasanya dihitung bersama-sama dengan *cleft lip*, 1 kejadian per 700 kelahiran (Kerrigan *et al.*, 2000). Melalui percobaan telah diperoleh data, 5 µg/kg bb TCDD, apabila diberikan pada induk mencit pada hari ke 9-10 kebuntingan, menyebabkan 60,3 % dari janin yang dihasilkan menderita cacat *cleft palate*; apabila dosis ditingkatkan menjadi 10 µg/kg bb, janin *cleft palate* yang dihasilkan mencapai 94,8 % (Hutahaean *et al.*, 2009). Pengamatan histologis yang telah dilakukan menunjukkan, bilah-bilah palatum mencit *cleft palate* yang diperoleh akibat pemberian TCDD memiliki gambaran yang khas yaitu struktur bilah palatum kerdil atau bilah palatum berukuran pendek (Hutahaean *et al.*, 2009).

Gambaran seperti itu mengisyaratkan TCDD menyebabkan hambatan pada pertumbuhan bilah palatum. Pada proses perkembangan organ, hambatan pertumbuhan dapat terjadi karena dua hal utama, adanya hambatan terhadap proliferasi sel atau adanya hambatan terhadap proses biosintesis. Dalam makalah ini dilaporkan efek TCDD terhadap biosintesis protein di jaringan palatum.

Biosintesis protein adalah komponen proses yang sangat penting dalam pertumbuhan dan perkembangan suatu organ. Organ-organ yang sedang berkembang membutuhkan protein baik untuk komponen struktur maupun sebagai komponen fungsional untuk berbagai proses biologis (Kalthoff, 1996).

Untuk menguji dugaan tersebut dibandingkan tingkat biosintesis protein di jaringan palatum embrio mencit dengan dan tanpa perlakuan TCDD. Jumlah butir AgNOR di dalam sel-sel palatum embrio digunakan sebagai indikator aktivitas biosintesis protein. *Nucleolar Organizing Region* (NOR) adalah tempat biogenesis ribosom di inti sel yang jumlahnya meningkat seiring dengan peningkatan aktivitas biosintesis protein sel. Peningkatan jumlah butir NOR terjadi karena meningkatnya kandungan protein-protein non-histon spesifik (terutama protein C23) pada sel-sel yang aktif melakukan sintesis protein. Protein-protein tersebut mengikat unsur Ag dari pereaksi Ag-NOR sehingga teramati sebagai butiran-butiran hitam di nukleus (Linder, 1993).

BAHAN DAN CARA KERJA

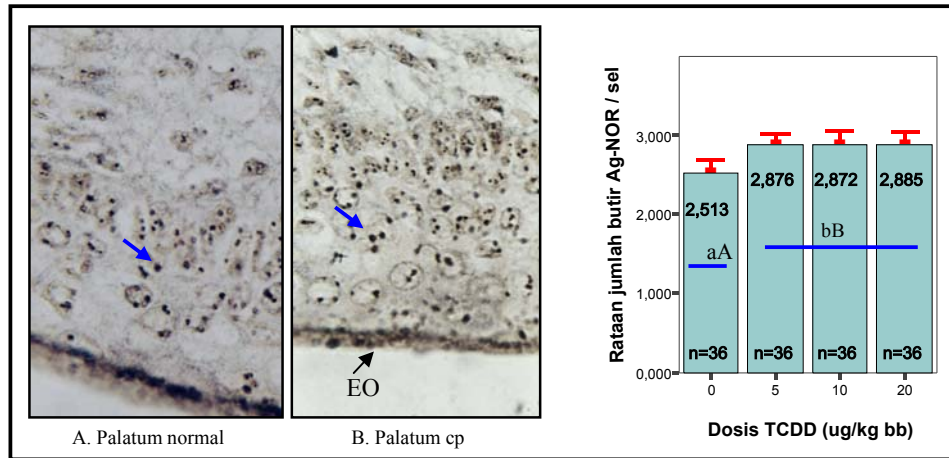
Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) bunting. Mencit bunting diperoleh dengan cara menempatkan 3 ekor mencit betina dara estrus semalaman dalam satu kandang dengan seekor mencit jantan fertil. Pagi hari dijumpainya sumbat vagina ditetapkan sebagai hari ke-0 kebuntingan. Delapan ekor mencit bunting dipelihara di dalam kandang pemeliharaan dan diberikan pakan dan air minum secara *ad libitum*. Kelompok perlakuan (6 ekor) dicekoki TCDD (Neosyn Lab, USA, kemurnian 98 %) masing-masing 5, 10, atau 20 µg/kg berat badan pada hari kebuntingan ke-12; sedangkan kelompok kontrol (0 µg/kg bb) diberi pelarut saja (minyak wijen). Induk dikorbankan pada hari kebuntingan ke-15, dibedah *caesar*, diambil janin yang dihasilkan, dan dipisahkan struktur kepalanya. Struktur kepala janin difiksasi di dalam formalin 4 %, kemudian dibuat irisan penampang palatum (*coronal section*) setebal 6µ dengan menggunakan metode parafin (Drury dan Wallington, 1976).

Penentuan butir Ag-NOR di sel-sel jaringan palatum dilakukan dengan teknik Ploton yang disempurnakan oleh Linder (Linder, 1993). Ringkasnya, preparat irisan dihilangkan parafinnya, dihidrasi, dan direndam di dalam air milli Q, lalu ditata di dalam wadah inkubasi yang tidak tembus cahaya. Jaringan ditetesi dengan pereaksi Cleland (ditiotretiol 1 %), kemudian dicuci dan direndam di dalam air mili Q. Pereaksi Ag-NOR (campuran 1 volume gelatin 2 % di dalam asam formiat 1 % dengan 2 volume AgNO₃ 50 %) dipersiapkan segera sebelum digunakan, ditetaskan pada jaringan dan diinkubasikan di ruang gelap pada suhu 23 °C. Selanjutnya preparat dicuci dan dicelup di dalam larutan Na-tiosulfat, didehidrasi, dijernihkan dengan xilol, dan akhirnya ditutup dengan bantuan balsem kanada. Butir hitam AgNOR dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 100 kali. Untuk tiap taraf perlakuan digunakan 6 slide jaringan, masing-masing slide diamati pada 6 lapang pandang, jumlah AgNOR dihitung pada 15 sel untuk tiap-tiap lapang pandang. Pemilihan lapang pandang dan sel yang diamati mengikuti sumbu bilah palatum memanjang dari proksimal ke distal. Data dianalisis dengan analisis varian dan dilanjutkan dengan

uji Duncan.

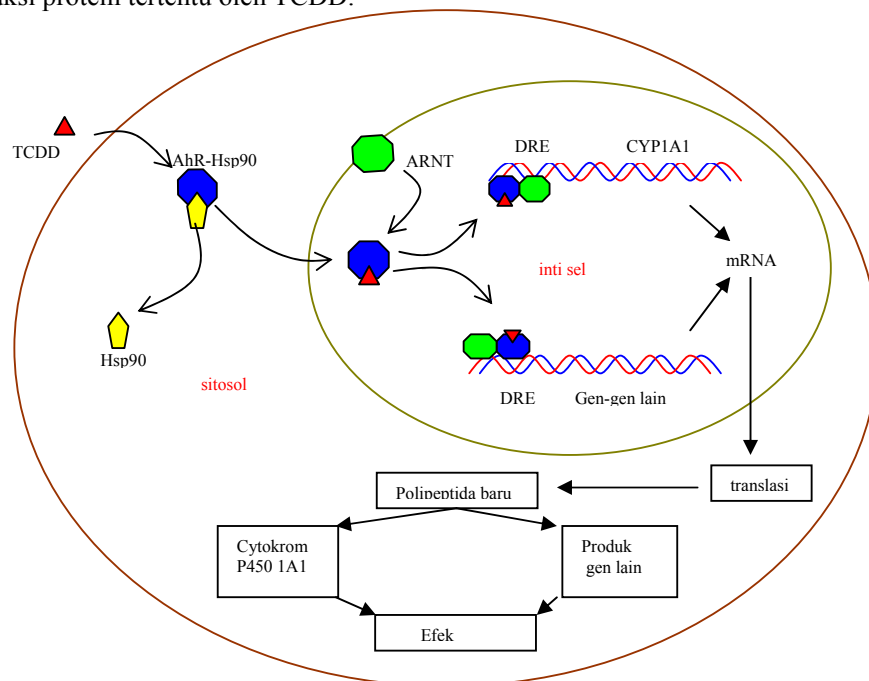
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian TCDD meningkatkan jumlah butir AgNOR di sel-sel jaringan palatum (ANOVA; $P > 0,05$). Gradik pada Gambar 1 memperlihatkan aktivitas biosintesis protein di jaringan kontrol lebih rendah daripada aktivitas biosintesis di semua kelompok perlakuan lainnya, sedangkan antar dosis perlakuan TCDD tidak terlihat perbedaan (DUNCAN; $P > 0,01$)



Gambar 12. Jumlah butir Ag-NOR di jaringan palatum. Gambaran mikroskopis jumlah butir AgNOR di jaringan kontrol (A) lebih rendah dibandingkan dengan di jaringan *cp* (B). Sel-sel dengan jumlah butir Ag-NOR 3 lebih banyak di B (panah); (EO: epitel bilah palatum wilayah oral). Grafik C menunjukkan rata-rata jumlah butir Ag-NOR lebih tinggi di jaringan *cp* akibat perlakuan TCDD ($P < 0,01$).

Hasil yang diperoleh tidak mendukung dugaan awal penelitian. Di awal penelitian diajukan dugaan bahwa induksi *cleft palate* oleh TCDD berkaitan dengan pengurangan aktivitas biosintesis di jaringan palatum. Akan tetapi, data yang diperoleh menunjukkan sebaliknya. Berdasarkan hasil tersebut, hambatan pertumbuhan bilah palatum bukanlah akibat langsung dari adanya pengurangan secara kuantitatif jumlah protein di jaringan. Meningkatnya aktivitas biosintesis protein akibat pemberian TCDD menunjukkan kemungkinan gangguan perkembangan palatum justru terkait dengan efek induksi protein tertentu oleh TCDD.



Gambar 2. Rangkuman kerja TCDD. Reseptor AhR tidak aktif karena diikat Hsp90. Jika molekul TCDD memasuki sel Hsp90 melepas AhR sehingga memungkinkan terbentuk kompleks AhR-TCDD yang segera memasuki inti dan didimerisasi ARNT. Kompleks 3 molekul TCDD-AhR-ARNT menjadi faktor transkripsi bagi sejumlah gen. Efek TCDD didasarkan pada respon sel terhadap aktivitas polipeptida yang dimodulasinya. (Hsp = *heat shock protein*; AhR = *aryl hydrocarbon receptor*; ARNT = *AhR nuclear translocator*; DRE = *dioxin- responsive enhancer element*; CYP1A1 = gen yang menyandi protein *cytokrom P450 1A1*) (Landers and Bunce, 1991, dengan modifikasi).

Efek toksik TCDD diperantarai oleh reseptor khusus (*Aryl hydrocarbon receptor / AhR*) yang terletak di sitosol (Gambar 2). Untuk dapat memunculkan efek toksiknya TCDD mula-mula menembus selaput sel dan diikat oleh AhR, kemudian memasuki inti dan membentuk senyawa kompleks baru dengan protein translokator *AhR Nuclear Translocator* (ARNT). Senyawa kompleks TCDD-AhR-ARNT mengikat ujung 5' sekuen promotor DNA tertentu (*Dioxin Responsive Element*) dan mempengaruhi ekspresi gen-gen di hilir promotor tersebut (Landers and Bunce, 1991; Denison and Heath-Pagliuso, 1998). Dengan cara itu TCDD mempengaruhi ekspresi ratusan gen (Boverhof *et al.*, 2005).

Pada awalnya AhR dikenal juga sebagai reseptor dioksin karena dalam jangka waktu lama ligan endogenous dan alamiah dari AhR tidak pernah ditemukan (Marika *et al.*, 1994). Belakangan diketahui terdapat sejumlah senyawa *polycyclic aryl hydrocarbon* (PAH) tak berhalogen dapat terikat ke AhR dan menghasilkan sejumlah efek biologis yang mirip seperti yang dihasilkan oleh dioksin dan *halogenated aryl hydrocarbon* (HAH) lainnya. Berbeda dengan HAH yang toksik, PAH tidak menimbulkan efek toksik. AhR yang mengikat ligan-ligan alamiah (kompleks PAH-AhR) akan melalui jalur yang sama seperti yang dilalui kompleks dioksin-AhR. Akan tetapi, AhR yang mengikat ligan alamiah dengan segera terdegradasi setelah reaksi berlangsung (Davarinos dan Pollenz, 1999), sedangkan AhR yang terikat dioksin mengalami stabilisasi, menyebabkan ekspresi gen yang dipengaruhi menjadi kontinu (Bohonowych dan Denison, 2004). Ekspresi gen yang terus-menerus membutuhkan sintesis rRNA dan ribosom yang lebih banyak dan berkelanjutan dan dengan demikian aktivitas sintesis ribosom di kromosom-kromosom spesifik meningkat. Jumlah butir Ag-NOR yang terdeteksi lebih tinggi di jaringan perlakuan mengisyaratkan TCDD mendorong sintesis protein berkelanjutan di palatum.

Di jaringan palatum, TCDD menginduksi ekspresi gen-gen faktor tumbuh, seperti TGF- α , TGF- β 1,2,dan 3, EGF (Abbott *et al.*, 1992). Fungsi fisiologis faktor tumbuh sangat mudah berubah tergantung pada waktu dan kadar sesaat di jaringan tempat kerjanya dan bersifat krusial pada proses perkembangan (Sporn *et al.*, 1986). Pada palatum manusia Abbott *et al.* (1988) juga melaporkan bahwa TCDD meningkatkan ekspresi sebagian faktor tumbuh. Dengan demikian, tampaknya terjadi karena TCDD menyebabkan kekacauan keseimbangan protein-protein faktor tumbuh di jaringan palatum yang selanjutnya mengganggu koordinasi proses-proses dasar perkembangan seperti proliferasi sel, apoptosis, dan diferensiasi sel yang sangat penting dalam keberhasilan palatogenesis.

KESIMPULAN

1. TCDD meningkatkan jumlah butir AgNOR di jaringan palatum. Rataan jumlah butir AgNOR / sel di jaringan palatum adalah $2,51 \pm 0,167$; perlakuan TCDD dosis 5 sampai dengan 20 $\mu\text{g/kg}$ bb meningkatkan rata-rata jumlah butir AgNOR hingga $2,88 \pm 0,160$.
2. Hambatan pertumbuhan palatum mencit akibat TCDD terjadi bukan akibat pengurangan aktivitas biosintesis protein.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, B.D., M.W. Harris, L.S. Birnbaum. 1992. Comparisons of the effects of TCDD and hydrocortisone to growth factor expression provide insight into their interaction in embryonic mouse palate. *Teratology* 45: 33 –53.
- Abbot, B.D., M.R. Probst, G.H. Perdew, A.R. Buckalew. 1998. Ah receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 expression in human

- embryonic palate and effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology* 58: 30–43.
- Anonimus. 1999. *Dioxin and Furan Inventories. National and Regional Emission of PCDD/PCDF*. United Nations Environment Programme, UNEP Chemicals, Geneva, Switzerland.
- Birnbaum, L. S. 1995. Developmental effects of dioxins. *Environ Health Perspect*, Volume 103 (Suppl 7): 89-94.
- Bohonowych, J., M. Denison. 2004. Binding of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to the AhR from various species is essentially irreversible. *Recent Advances In TCDD Toxicology, Organohalogen Compounds*, Volume 66: 3338-3342.
- Boverhof, D.R., L. D. Burgoon, C. Tashiro, B. Chittim, J. R. Harkema, D. B. Jump, T.R. Zacharewski. 2005. Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-mediated hepatotoxicity. *Toxicological sciences* 85:1048–1063.
- Davarinos, N.A., R. S. Pollenz. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 40, Oct. 1: 28708–28715.
- Denison, M.S., S. Heath-Pagliuso. 1998. The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological action of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 557-568.
- Drury, R.A.B., E.A. Wallington. 1976. *Charleton's histological technique*. Oxford Univ. Press.
- Ferguson, M.W.J. 1988. Palate development. *Development* 103 (Suppl): 41-60.
- Fiedler, H. 2000. Sources of PCDD/PCDF, monitoring, levels in environment, guidelines and regulations. *Proceeding of the UNEP Chemical Subregional Workshop on Identification and Management of Dioxin/Furan and PCBs, Seoul, 24-28 Juli 2000*. UNEP, Geneva, Switzerland.
- Hutahaean, S., S. Mangkoewidjojo, M. Sagi, and W. Asmara. 2009. Induksi cacat *cleft palate* pada embrio mencit (*Mus musculus*, L) oleh 2,3,7,8-Tetrakloro-*p*-dioksin (TCDD) (Dalam proses publikasi)
- Kalthoff, K. 1996. Analysis of biological development. McGraw-Hill, Inc., New York. Kaufman, M.H. 1992. *The atlas of mouse development*. Academic Press, London.
- Kerrigan, J.J., J.P. Mansell, A. Sengupta, N. Brown, J.R. Sandy. 2000. Palatogenesis and potential mechanism for clefting. *J.R. Coll. Surg. Edinb.*, 45: 351-358.
- Kimbrough, R.D. 1998. Selected other effects and TEF. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 17: 265-273.
- Landers, J.P., N.J. Bunce. 1991. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* 276: 273-287.
- Lilienfield, D.E., dan M.A. Gallo, 1989. 2,3-D, 2,3,5-T, and 2,3,7,8-TCDD: An Overview. *Epidemiologic Reviews.* 11:28-58.
- Linder, L. 1993. Improvement in the silver staining technique for Nuclear Organizer Region (AgNOR). *J. Histochem. Cytochem.* 41 (3): 439-445.
- Marika, I.K., L. Poellinger, J-A. Gustafsson. 1994. Regulation of human dioxin receptor function by indolecarbazole, receptor ligands of dietary origin. *J. Biol. Chem.* 269 (7): 5147-5154.
- Safe, S. 1998. Limitation of the Total Equivalency Factor approach for risk assesment of the TCDD and related compound. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 17: 285-304.
- Sporn, M.B., A.B. Roberts, L.M. Wakefield, R.K. Assoian. 1986. Transforming growth factor- β : Biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-534.