

AKTIVITAS PROTEASE DAN PROFIL PROTEIN PADA HEPAR TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) PASCA INDUKSI *CYLOSPORINE-A*

Ajeng Diyan Pratiwi, Aulanni'am*, Sutrisno

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Cyclosporine-A (CsA) adalah immunosupresan yang disintesis dari jamur *Tolypocladium inflatum GamsIII*. CsA secara luas digunakan dalam pengobatan penyakit autoimun. Namun, secara klinis dan eksperimental penggunaan CsA dibatasi oleh beberapa efek, salah satunya hepatotoksisitas. Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih jantan dengan pemberian dosis CsA yaitu 3 mg/kg berat badan tikus. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan aktivitas protease sebesar 40,3% dengan aktivitas protease berturut-turut 0.163 ± 0.0015 dan 0.273 ± 0.0018 $\mu\text{mol/mL}$. menit untuk tikus kontrol dan pasca induksi CsA. Sedangkan untuk hasil profil pita protein didapatkan perbedaan pita protein sebanyak 3 buah dengan adanya 2 pita protein baru pada BM secara berurutan sekitar 54.4 dan 99.8 kDa, serta adanya 1 pita protein yang hilang pada 79 kDa.

Kata kunci: *Cyclosporine-A*, aktivitas protease, profil protein

ABSTRACT

Cyclosporine-A (CSA) is an immunosuppressant that is synthesized from fungus *Tolypocladium GamsIII inflatum*. CSA is widely used in the treatment of autoimmune diseases. However, clinical and experimental use of CSA is limited by several effects, which one is hepatotoxicity. In this animal studies used male white rats with CSA dose is 3 mg/kg body weight of rats. The results showed an increase in protease activity by 40,3% with protease activity respectively 0.163 ± 0.0015 and 0.273 ± 0.0018 $\mu\text{mol/mL}$. minute to control rats and after induction of CsA. As for the results obtained the difference profiles of 3 pieces protein bands in the presence of two new protein bands in sequential BM-contributed approximately 54.4 and 99.8 kDa, and the presence of one of the missing protein bands at 79 kDa.

Keyword: *Cyclosporine-A*, protease activity, protein profiles

PENDAHULUAN

Cyclosporine-A (CsA) adalah immunosupresan yang disintesis dari jamur *Tolypocladium inflatum Gams*. CsA digunakan sejak pertengahan 1980-an sebagai pencegah penolakan transplantasi organ [1]. Selain itu, CsA juga digunakan secara luas dalam pengobatan penyakit autoimun seperti uveitis, arthritis, arthritis psoriasis, nephritic syndrome, penyakit radang usus dan primary biliary cirrhosis. Secara klinis dan eksperimental penggunaan CsA dibatasi oleh beberapa efek samping yang ditimbulkan seperti nefrotoksisitas, kardiotoxikitas, hipertensi dan hepatotoksisitas [2]. Efek tersebut terjadi jika CsA digunakan dalam jangka waktu panjang yang diketahui dapat menyebabkan stress oksidatif pada jaringan sebagai

bentuk peningkatan kadar radikal bebas yang bersifat sangat reaktif karena mempunyai elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya.

Mekanisme CsA sebagai penyebab kerusakan hepar belum sepenuhnya dikaji secara mendalam. Salah satu uji klinis dalam pemasaran obat yaitu uji hepatotoksitas. Setelah uji tes tersebut, hepatotoksitas tak terduga masih dapat terjadi[3]. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dibahas mengenai dampak CsA terhadap hepar.

Induksi CsA bersifat toksik pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena mampu memicu produksi ROS yang berlebih. Aktivitas enzim protease dalam tubuh berfungsi memecah molekul protein dengan menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Adanya peningkatan ROS yang berlebih pada hepar, secara tidak langsung juga memicu peningkatan aktivitas enzim protease yang berlebih sehingga mampu merusak dari kerja hepar melalui inflamasi pada hepar dan perubahan profil pita protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemaparan *Cyclosporine-A* (CsA) terhadap aktivitas enzim protease dan perubahan profil protein pada hepar. Penelitian ini masih sangat terbatas, sehingga masih perlu dikembangkan lagi.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah KCl, HCl, KH_2PO_4 , dinatrium hidrogen fosfat (Merck KgaA, 64271 Darmstadt), KMnO_4 1 M (Merck), NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, *Tween*, Tris-HCl, Na_2CO_3 anhidrat (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), NaOH, PMSF, RSB, H_2SO_4 , tirosin, etanol absolut 98%, metanol absolut 98%, akuades steril, tri chloroacetic acid (TCA).

Alat yang digunakan yaitu seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas objek, labu takar (10, 100, 500, dan 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, gelas kimia (50, 250, 500, dan 1000 mL), pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas, gelas arloji, mortar, mikro pipet (10, 20, 200, dan 1000 μL), penangas air, waterbath, stirer, botol semprot, appendof, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), penjepit, pisau mitokrom, neraca analitik, seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR 401, inkubator, vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV, autoclaf, tisu, sarung tangan.

Preparasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Preparasi hewan coba dilakukan selama 4 minggu untuk mengkondisikan keadaan lingkungan dan berat badan di Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kontrol dan induksi selama 21 hari sebanyak 5 ekor per kelompok. Dosis penggunaan Cyclosporine-A adalah 3 mg/kg berat badan tikus. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari KEP UB no. 114.

Pengambilan organ hepar

Pengambilan organ hepar pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-22 setelah 3 minggu diinduksi *Cyclosporine-A*. Langkah awal yang harus dilakukan adalah mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian perut, tikus diletakkan dengan posisi perut di atas pada papan pembedahan. Kemudian diambil bagian hepar, diisolasi dan dipotong. Hepar dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin, lalu hepar dibagi menjadi dua dimana $\frac{1}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan Paraformaldehid (PFA) 10% dan $\frac{3}{4}$ bagian dimasukkan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4.

Isolasi protease

Organ hepar seberat 0,5 gram dipotong kecil-kecil, lalu ditambahkan larutan PBS-Tween:PMSF (9:1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin. Setelah itu ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi selama 10 menit dan diputar dengan alat sentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu diputar selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 dan dilakukan homogenasi.

Pengukuran aktivitas protease

Kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L dan larutan bufer fosfat pH 7 sebanyak 300 μ L dan 100 μ L ekstrak kasar protease dicampurkan lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37⁰C di atas penangas air. Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 27⁰C(suhu kamar). Selanjutnya diputar dengan alat sentrifugasi 4000rpm

selama 10 menit. Supernatan diambil 100 μL dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan bufer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya satu mikromol tirosin per menit pada kondisi optimal enzim tersebut pada reaksi enzimatik.

Pemisahan dan karakterisasi protein dengan SDS-PAGE

Profil protein dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis*) yang dilakukan dengan metode standar. Sejumlah 10 μL sampel isolat protein ditambah 10 μL Tris-cl + 20 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*), dan dimasukkan ke dalam mikrotube, kemudian dipanaskan pada suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 200 Volt selama 45 menit. Untuk staining protein digunakan *Coomassie brilliant blue* 0,1% (w/v).

Profil protein hasil SDS-PAGE

Analisa berat molekul (BM) masing-masing protein hasil isolasi hepar dengan menggunakan protein Marker sebagai standar. Hasil *scanning* pita-pita protein diplotkan ke dalam kurva persamaan regresi linier sehingga didapatkan nilai BM protein pada masing-masing sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh induksi CsA terhadap aktivitas protease

Aktivitas enzim protease pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi CsA diamati melalui uji aktivitas protease hasil isolasi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diukur pada kondisi optimum yaitu pH 6,5 dengan suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ dan waktu inkubasi 60 menit [4].

Tabel 1. Data rata-rata aktivitas protease

Kelompok	Rataan aktivitas protease $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$
Kontrol	0,136 \pm 0,0012
CsA	0,227 \pm 0,0014

Induksi CsA dengan dosis 3 mg/kg BB sebanyak 200 μL dapat meningkatkan aktivitas protease sebesar 40,3% pada tikus yang diinduksi CsA dibandingkan dengan tikus kontrol

dengan rata-rata $0,163 \pm 0,0015 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ menjadi $0,273 \pm 0,0018 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ (Tabel 1). Hasil analisa uji statistik dengan uji t, diperoleh bahwa $t_{\text{hitung}} > t_{\text{tabel}}$ sehingga menunjukkan bahwa CsA memberikan pengaruh nyata dikarenakan adanya perubahan nilai yang cukup signifikan antara t_{hitung} dan t_{tabel} ($t_{\text{hitung}}=4,48$; $t_{\text{tabel}}=1,812$).

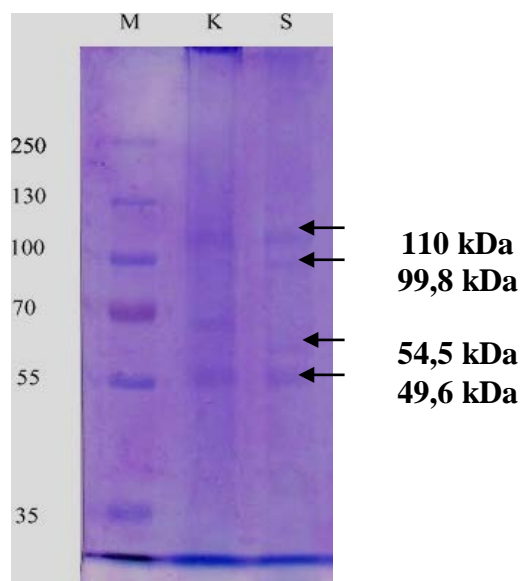
Fox *et al* melaporkan bahwa meskipun mekanisme yang mendasari hepatotoksitas dalam CsA belum sepenuhnya diketahui, namun data kumulatif menunjukkan bahwa CsA bertanggung jawab dalam peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) dalam sel hepatosit tikus yang diinduksi CsA sehingga mampu merusak jaringan hepar.

Mekanisme kerja CsA sebagai respon imun adalah menekan secara langsung sel T helper, sehingga produksi GSH sebagai antibodi alami dalam hepar berkurang. Berkurangnya GSH mengganggu sistem pertahanan sel terhadap stress oksidatif yang memicu berkurangnya sel hepatosit dan merusak kinerja fungsi enzim. Sel hepatosit yang berkurang tersebut dikatakan mengalami inflamasi yang akan mengaktifkan neutrofil elastase sebagai bentuk salah satu sitokin kemudian memproduksi ROS dan melepaskan protease. Aktivitas protease yang berlebihan tersebut dikarenakan CsA mampu memicu peningkatan konsentrasi GSH sehingga perlindungan GSH terhadap sel hepatosit menjadi melemah. Faktor inilah yang diduga sebagai penyebab gangguan fungsi hepatoseluler, dimana semakin banyak protease yang disekresikan, maka kerusakan membran sel semakin parah [5].

Pengaruh induksi CsA terhadap profil pita protein

Induksi CsA memicu pemutusan rantai protein sehingga menyebabkan perubahan kadar antigen protein yang dinamakan degradasi protein yang menyebabkan perubahan struktur protein. Protein yang terdegradasi itu mengalami dua kemungkinan, yaitu pengembangan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Perubahan protein tersebut diketahui dengan mengamati profil protein setelah dilakukan elektroforesis SDS-PAGE [6].

Gambar 1 menunjukkan adanya pita protein yang muncul dengan teknik SDS-PAGE antara tikus kontrol dan tikus pasca induksi CsA. Tikus kontrol tanpa perlakuan *Cyclosporine-A* terdapat 3 pita protein yang muncul dengan masing-masing berat molekul 109,5 kDa, 79 kDa, dan 49,6kDa. Berbeda dengan tikus yang mendapat perlakuan dengan *Cyclosporine-A* terdapat perubahan pada profil protein yaitu kehilangan pita protein pada 79 kDa dan justru bertambahnya pita protein yang baru pada 99,8 kDa dan 54,5 kDa. Berikut seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 1. Profil pita protein ginjal tikus (*Rattus Norvegicus*) normal dengan tikus (*Rattus norvegicus*) pasca induksi Cyclosporine-A

Tabel2. Berat Molekul (BM) protein isolasi hepar tikus kontrol dan pasca induksi CsA

Sumuran	BM Protein (kDa)				
	49,6	54,5	79	99,8	110
Kontrol	√	-	√	-	√
CsA	√	√	-	√	√

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa induksi CsA mampu meningkatkan aktivitas protease pada hepar tikus sebesar 40,3% dari $(0,163 \pm 0,0015)$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ menjadi $(0,273 \pm 0,0018)$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Terdapat perbedaan pita protein yaitu sebanyak 3 buah dengan adanya 2 pita protein baru pada BM secara berurut-turut sekitar 54,4 kDa dan 99,8 kDa, serta adanya 1 pita protein yang hilang pada 79 kDa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Dr. dr, Niniek Sumardi, Sp. PA atas kesempatannya dalam memberikan izin untuk menjadi bagian dari payung penelitian, juga Mujianto Nugroho, S.Si yang telah memberikan masukan dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ponticelli C., 2000, *Cyclosporine: Nephrologic Indications, dalam Yocum De (Ed), Cyclosporine, Clinical Application in Autoimmune Diseases*, Philadelphia, Mosby-Wolfe:11-20.
2. Rezzani, 2004, *Siklosporin-A dan Efek Samping pada Organ:Histokimia Penelitian,Prog Histochem Cytochem*, 39 (2) :85-128.
3. Murray, R., 2008,*Five Recent Abstract On Formaldehyde Damage to Cells Vitamin E and Selenium Protect*, Santa Fe New Mexico, USA.
4. Ranuh, R., Subijanto MS., Ingrid S., and Aulanni'am, 2008,*The Role of Probiotik Lactobacillus Plantarum IS 20506 on Occludin and ZO-1 of Intesnal Tight Junctions Rehabilitation*, Makalah Seminar Nasional Basic Science Universitas Brawijaya. Malang.
5. Jimenez R., Galan A.I., Gonzalez de Buitrago J.M., Palomero J., and Munoz M.E. 2000, *Metabolisme Glutathione dalam Siklosporin A- dengan Perlakuan Tikus: Dosis dan Waktu yang Berhubungan dengan Perubahan dalam Hati dan Ginjal*, Clin Exp Pharmacol Physiol, 27 (12) :991-996.
6. Tetriana, D., Darlina, Armanu, and Mukh Syaifudin, 2008,*Pengaruh Radiasi Gamma terhadap Profil Protein Plasmodium berghei Stadium Eritrositik*, Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan, dan Lingkungan, Depok.