

2017-DEWI_NK-
MONOGRAF_MT__(PAK) (1).pdf
by

Submission date: 06-Sep-2019 02:53PM (UTC+0700)

Submission ID: 1168095355

File name: 2017-DEWI_NK-MONOGRAF_MT__(PAK) (1).pdf (1.83M)

Word count: 13551

Character count: 85384

MONOGRAF

METALLOTHIONEIN

Nur Kusuma Dewi

29

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2017

MONOGRAF

METALLOTHIONEIN

Nur Kusuma Dewi

Diterbitkan oleh :

29

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

2017

34

Hak Cipta © pada penulis dan dilindungi Undang-Undang
Penerbitan.

Hak Penerbitan pada FMIPA PRESS.

Dicetak oleh FMIPA Press.

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dalam
bentuk apapun tanpa izin dari penulis.

BUKU MONOGRAF

METALLOTHIONEIN
ISBN : 9786021034767

Dr. Nur Kusuma Dewi, M.Si.

Penyunting : Dr. Ari Yuniastuti, M.Kes

Desain Cover dan lay out : Yoris Adi Maretta

PRAKATA

Puji¹¹ syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas Rahmat, Hidayah, Syafa'at, dan Inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Buku Monigraf Metallothionein ini. Monograf ini merupakan salah satu wujud tulisan dari hasil penelitian tentang satu bidang kajian, tentang Metallohionein yaitu sebuah protein yang mengikat logam utamanya dalam tulisan ini adalah logam berat kadmium.

Monograf ini membahas tentang struktur dan klasifikasi metallothionein, peran dan fungsi metallothionein, teknik isolasi, mekanisme biokimia, dan metallothionein sebagai biomarker.

Penulis berharap monograf ini dapat digunakan sebagai sumber informasi penting bagi para peneliti lingkungan, para pakar dan praktisi lingkungan serta masyarakat luas dalam mengkaji toksikologi logam berat dari tinjauan molekuler yang terjadi di lingkungan.

Penyusunan buku monograf ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak.³⁶ Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak pihak yang telah memberikan bantuan demi terwujudnya buku monograf ini.

¹¹ Pendapat dan saran yang bersifat konstruktif dari pembaca, para ahli, dan teman sejawat sangat penulis harapkan.

Semoga tulisan ini bermanfaat bagi yang berminat.

Semarang, Maret 2017

Penulis

Nur Kusuma Dewi

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| 13 ALAMAN JUDUL | i |
| KATA PENGANTAR | ii |
| DAFTAR ISI | v |
| DAFTAR TABEL | vii |
| DAFTAR GAMBAR | vii |
| | i |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Rumusan Masalah | 5 |
| 1.2 Tujuan | 5 |
| 1.3 Metode Pemecahan Masalah | 5 |
| BAB II STRUKTUR DAN KLASIFIKASI METALLOTHIONEIN | 6 |
| 2.1 Struktur Metallothionein | 6 |
| 2.2 Klasifikasi Metallothionein | 8 |
| 2.3 Karakteristik Metallothionein | 11 |
| 2.4 Metallothionein 1 dan Metallothionein 2 | 11 |
| 2.5 Metallothionein 3 dan Metallothionein 4 | 13 |
| BAB III PERAN DAN FUNGSI METALLOTHIONEIN | 15 |
| 3.1 Peran metallothionein | 15 |
| 3.2 Fungsi metallothionein | 16 |
| 3.2.1 Metallothionein sebagai pembersih radikal bebas | 16 |
| 3.2.2 Metallothionein untuk detoksifikasi logam berat | 16 |
| 3.2.3 Metallothionein sebagai biomarker paparan logam berat | 17 |
| 3.2.4 Metallothionein sebagai pelindung keracunan Kadmium | 18 |
| 3.2.5 Metallothionein berkaitan dengan karsinogenesis | 19 |
| 3.2.6. Metallothionein sebagai fungsi Redoks | 19 |
| 3.2.7 Fungsi protektif Metallothionein | 20 |
| 3.2.8 Hubungan Metallothionein dengan apoptosis | 21 |
| BAB IV TEKNIK ISOLASI METALLOTHIONEIN | 21 |
| 4.1 Isolasi metallothionein | 21 |
| 4.1.1 Isolasi DNA metallothionein dari darah | 22 |
| 4.1.2 Amplifikasi gen MT-2A | 24 |
| 4.1.3 Elektroforesis gel | 27 |
| 4.2 Isolasi metallothionein organ hati ikan | 29 |
| 4.3 Isolasi metallothionein gonad ikan | 30 |
| 4.4 Analisis ekspresi MT-A dengan HPLC | 31 |
| BAB V MEKANISME BOKIMIA METALLOTHIONEIN | 33 |
| 5.1 Interaksi Metallothionein | 33 |

| | |
|---|----|
| 5.2 Eksplikasi dan Implikasi | 34 |
| 5.3 Metallothionein pada manusia | 37 |
| BAB VI METALLOTHIONEIN SEBAGAI BIOMARKER | 39 |
| 6.1 Analisis Metallothionein ikan | 39 |
| 6.2 Analisis ekspresi Metallothionein manusia | 40 |
| BAB VII PENUTUP | 47 |
| DAFTAR PUSTAKA | 49 |
| GLOSSARIUM | 51 |
| INDEKS | 53 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Primer MT-2A untuk amplifikasi gen MT | 26 |
| Tabel 2. Distribusi frekuensi kadar timbal dalam darah Pekerja SPBU Kota Semarang | 40 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Struktur Metallothionein | 7 |
| Gambar 2. Sekuen asam amino isoform MT-2A | 9 |
| Gambar 3. Diagram pita struktur MT-2 hati ikan | 10 |
| Gambar 4. Skema gambar dua kelompok logam tiolat | 12 |
| Gambar 5. Ikatan Zn-S | 20 |
| Gambar 6. Bagan Alur Isolasi DNA dan Metallothionein | 23 |
| Gambar 7. Mesin PCR | 25 |
| Gambar 8. Perangkat elektroforesis gel | 28 |
| Gambar 9. Perangkat EZ-Chrom HPLC | 31 |
| Gambar 10. Hasil Isolasi dan purifikasi DNA | 41 |
| Gambar 11. Elektroforegram sampel A1-MT2A | 42 |
| Gambar 12. Elektroforegram sampel A2-MT2A | 42 |
| Gambar 13. Urutan basa nukleotida gen MT | 45 |

BAB I

PENDAHULUAN

Metallothionein(MT) adalah sejenis protein non-enzim yang memiliki ikatan dengan logam baik logam esensial maupun non esensial. *Metallothionein* ditemukan pertama kali pada tahun 1957 oleh Margoshes dan Valle. Keduanya melakukan identifikasi faktor yang bertanggung jawab terhadap mekanisme akumulasi kadmium secara alami pada jaringan korteks ginjal kuda. Faktor tersebut kemudian diketahui sebagai protein pengikat kadmium (Cd) yang tersusun dari protein (*thionein*) dan logam Cd membentuk suatu struktur kompleks *metallothionein* (Carpeneet *al.*, 2007). Vasak dan Meloni dalam *Metallothionein in Biochemistry and Pathology* mendefinisikan *metallothionein* adalah “*a superfamily of low molecular-mass cysteine and metal-rich proteins or polypeptides conserved through evolution and present in all eukaryotes and certain prokaryotes*” (Zatta 2008). MT memiliki protein/polipeptida dengan kandungan logam dan asam amino sistein yang sangat tinggi serta memiliki berat molekul rendah. *Metallothioneins* (MTs) merupakan superfamili protein dari 15 famili yang diperoleh dari hasil pemeriksaan asam amino maupun polinukletida dari semua filum hewan, jamur tertentu, tanaman serta *cyanobacteria*. Pada mamalia Gen MT memiliki empat subfamili yaitu MT-1 dan MT-2 yang terlibat dalam homeostasis seng dan perlindungan dari toksisitas logam berat dan stres oksidatif, MT-3 yang berperan sebagai faktor penghambat di otak dan MT-4 yang berperan dalam regulasi pH asam lambung dan indera perasa pada lidah.

Studi tentang MTs meliputi berbagai bidang kompetensi yaitu kimia analitik dan spektroskopi struktural untuk biologi molekuler

dan kedokteran. Sampai saat ini belum ada metode kuantifikasi sederhana untuk mendeteksi konsentrasi jaringan MT. Adapun spektroskopi NMR 2D menunjukkan bahwa meskipun berbeda urutan asam amino, tata ruang MTs memiliki ciri yang sama yaitu keberadaan 2 kelompok gugus logam-thiolat yang mengandung 3 logam kovalen untuk domain β dan 4 logam kovalen untuk domain α .

Metallothionein merupakan polipeptida yang memiliki banyak asam amino Sistein (*Cys*). Konsekuensinya MT mengandung kelompok molekul *thiol* (*sulfidril* atau *-SH*) dalam jumlah yang besar. Kelompok *thiol* ini dapat mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien, baik logam esensial maupun non esensial, termasuk seng (Zn), merkuri (Hg), tembaga (Cu), dan kadmium (Cd). Residu *Sulfidril* mampu mengikat logam dimana 1 ion logam diikat oleh 3 residu *-SH* atau 1 ion logam dengan 2 residu *-SH*. Koordinasi pengikatan dari setiap ion logam melalui residu *-SH* yang ada pada *Cys*, membentuk struktur *tetrahedral tetrathiolate* (Zatta, 2008). Keberadaan ion logam dalam gugus-gugus MT dapat mengalami proses dimerisasi oksidatif. Ikatan MT yang terbentuk memberikan kestabilan termodinamika yang tinggi. Di sisi lain, struktur MT memiliki kestabilan kinetika yang sangat rendah. Dengan demikian, MT dapat mengikat ion logam dengan sangat kuat, tetapi peluang pertukaran ikatan-ikatan antara ion logam dan protein pun cukup besar (Zangger *et al.*, 2001).

Jenis logam dan asam amino pembentuk MT yang bervariasi menuntut adanya penggolongan secara ilmiah. Secara umum, MT memiliki struktur dasar berupa unsur logam dan asam amino sebagai penyusun badan proteinnya. Berat molekul MT pada mamalia adalah 6000–7000 Da, dengan struktur MT 60–68 residu asam amino tanpa asam amino

aromatik. Dua puluh asam amino diantaranya merupakan asam amino *Sistein (Cys)* yang mengikat 7 ion logam ekuivalen maupun bivalen pada setiap molekul MT. Sejauh ini MT ikan *teleostei* diketahui memiliki 60-61 residu asam amino. Semua asam amino *Sistein* berada dalam keadaan tereduksi dan terkoordinasi dengan ion logam melalui ikatan *mercaptida*, sehingga menimbulkan sifat khusus *spektroskopik* gugus *metal-thiolate*. Berdasarkan rekomendasi *The Committe of theNomenclature of Metallothionein*, segala macam protein atau polipeptida dengan struktur interaksi dan fungsi menyerupai *metallothionein* seperti yang terdapat pada mamalia dapat diklasifikasikan sebagai *metallothionein*(Binz, 2000).

Pada hewan, logam akan terikat pada residu *cys* dalam formasi logam-*cys(thiolate)* dengan cara pertukaran ion logam misalnya ion Zn tergantikan dengan ion Cu, Cd, atau Hg (Duncan dan Stillman,2006). Menurut Zanggeret *al.*, (2001), MT mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan logam dapat berlangsung dengan mudah karena ikatan MT terhadap logam memiliki stabilitas termodinamik yang tinggi dan stabilitas kinetik yang rendah. Dengan kata lain MT yang mengikat logam Cd dapat dengan mudah mengalami pertukaran ikatan dengan logam yang lain bila terjadi gangguan keseimbangan termodinamik dan keseimbangan kinetik. Selain berfungsi untuk detoksifikasi logam berat, berbagai fungsi seluler MT adalah untuk pengaturan homeostasis logam esensial, perlindungan terhadap radiasi dan kerusakan oksidatif, dan kontrol seluler (Hall, 2002). Penerapan ekspresi*metallothionein* pada ikan telah dapat memberikan informasi terkait sistem deteksi pencemaran logam berat secara biologis (Baeet *al.*, 2005; Brammel dan Wigginton, 2010; Montaseret *al.*, 2010). *Metallothionein* merupakan protein yang berfungsi untuk

mendetoksifikasi logam dan untuk menjaga homeostasis logam di dalam sel (Cobbett and Goldbrough, 2002).

Keberadaan *metallothionein* memiliki setidaknya dua fungsi utama, yaitu membersihkan materi radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dan detoksifikasi logam untuk mencapai keadaan homeostasis (Carpeneet *al.*, 2007). Molekul MT yang memiliki sejumlah besar kelompok *thiol/sulfidril* dengan sifat *nukleofilik* membuat MT mampu mengikat tidak hanya logam tetapi juga radikal bebas. Hal ini merupakan cara MT untuk melindungi sel dari senyawa mematikan. Distribusi MT dalam sel memungkinkan mereka untuk melindungi semua kelompok sel terhadap bahaya tersebut (Campagneet *al.*, 2000). Dengan demikian biomarker MT selain dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran logam, juga berperan sebagai detoksifikasi logam dalam tubuh (Carajavilleet *al.*, 2000; Downset *al.*, 2001; Petrovicet *al.*, 2001; Blaiseet *al.*, 2002; Gagn'eeet *al.*, 2002; Ch`evreet *al.*, 2003; Domouthsidouat *al.*, 2004).

Adapun fungsi kedua adalah sebagai detoksifikasi logam untuk mencapai keadaan *homeostasis*, sehingga adanya *metallothionein* menyebabkan organisme menjadi resisten terhadap paparan logam berat dan menyebabkan toksisitas dari logam berat berkurang (Carpeneet *al.*, 2007; Cobbett dan Goldbrough 2002; Hall, 2002). Salah satu logam berat yang dapat berikatan dengan MT adalah kadmium (Cd). Metabolisme logam berat ³⁹ di dalam tubuh organisme merupakan faktor utama yang menentukan toksisitas zat tersebut. Kadmium dan *metallothionein* (*Cd-thionein*) akan bereaksi secara antagonis. Palar (2008) menjelaskan bahwa reaksi antagonis secara toksikologi adalah proses atau peristiwa pengurangan atau bahkan penghapusan toksisitas suatu zat atau senyawa toksik. Dengan demikian, kompleks senyawa *Cd-thionein*

yang terbentuk akan dapat menurunkan toksisitas logam kadmium (Binz 2000, Carpeneet *al.*, 2007).

Selain kedua fungsi di atas, peran MT sebagai proteinyang terlibat dalam metabolisme logam sangat diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan dan fungsi organisme. Selain itu MT berperan sebagai reservoir dari logam seperti tembaga atau seng (Cu dan Zn). *Metallothionein* menyediakan makro molekul yang membutuhkan seng dan tembaga sebagai mikro elemen organisme. *Metallothionein* juga mengembalikan fungsi yang tepat untuk ikatan protein-logam yang sebelumnya tidak aktif dan menjadi aktif setelah berikatan dengan logam (fungsi logam sebagai kofaktor enzim). Sebagai contoh, protein yang kehilangan kemampuan dalam mengikat pajanan Cd, akan dapat kembali mengikat Cd setelah terjadi ikatan seng-*metallothionein* (ZnMT). Dengan demikian MT terlibat dalam pertukaran Zn-Cd (Plaa, 2007, Klaassen, 2001). Selain Cd, MT juga dapat berikatan dengan logam lain seperti seng (Zn), nikel (Ni), timbal (Pb) dan tembaga (Cu). Walaupun secara umum MT dapat berikatan dengan semua jenis logam akan tetapi interaksi MT dengan golongan logam berat umumnya mendapat perhatian lebih terkait dengan toksisitas yang ditimbulkan.

Metallothionein (MT) dapat berfungsi sebagai biomarker untuk monitoring adanya pajanan dan toksisitas logam di perairan laut. Sejauh ini, MT merupakan satu-satunya senyawa biologis dalam tubuh yang berinteraksi dengan logam secara alami sehingga sangat tepat jika dijadikan sebagai bioindikator atau biomarker. Program pemantauan (biomonitoring) perairan untuk mengetahui adanya pajanan logam sering menggunakan organisme yang berasal dari lingkungan perairan asin, seperti laut, muara dan zona pasang surut (Legras *et al.*, 2000). Chaabouni (2011) melaporkan adanya penggunaan MT sebagai

biomarker untuk penilaian kualitas lingkungan di Teluk Gabes. Spesies ikan dan kerang digunakan sebagai biomarker pencemaran. Penggunaan organisme sebagai biomarker dikarenakan MT dalam tubuh organisme memegang peranan penting dalam pengelolaan mekanisme metabolisme dan transisi seluler materi logam didalam tubuh, terutama ion-ion logam berat (Binz 2000). Selain itu ekspresi MT umumnya meningkat dengan adanya pajanan logam Zn, Cu, Cd, Hg dan Ag (Viarenggo *et al.*, 2000), serta toksisitas selular akan meningkat jika kecepatan masuknya logam ke dalam sel melebihi kecepatan sintesis MT.

1.1. Rumusan Masalah

Berdasarkan hal-hal tersebut, permasalahan yang dikaji untuk pemecahan permasalahan tersebut di atas dalam buku ini adalah

1. Bagaimana mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa *metallothionein*?
2. Bagaimana mekanisme biokimia *metallothionein* terhadap cemaran logam berat ?
3. Bagaimana peran *metallothioneins* sebagai biomarker pada ikan dan manusia yang terpapar logam berat?

1.2. Tujuan

Berdasarkan hal-hal tersebut, permasalahan yang dikaji untuk pemecahan permasalahan tersebut di atas dalam buku ini adalah

1. mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa *metallothionein*
2. Mengkaji dan memaparkan mekanisme biokimia *metallothionein* terhadap cemaran logam berat

3. Menganalisis peran *metallothionein* sebagai biomarker pada ikan dan manusia yang terpapar logam berat?

1.3 Metode pemecahan masalah

Permasalahan tersebut di atas dapat dipecahkan dengan melakukan kajian pustaka dan hasil-hasil penelitian tentang pengertian *metallothionein*, struktur dan klasifikasi *metallothionein*, dan fungsi *metallothionein*. Dalam tulisan ini dibahas kajian teoritis dan hasil penelitian tentang :

1. Struktur dan klasifikasi *metallothionein*
2. Peran dan Fungsi *metallothionein*
3. Teknik isolasi senyawa *metallothionein*
4. Mekanisme biokimia *metallothionein* terhadap cemaran logam berat
5. Peran Metallothionein sebagai Biomarker pada ikan dan Manusia

BAB II

STRUKTUR DAN KLASIFIKASI METALLOTHIONEIN

2.1. Struktur Metallothionein

Metallothioneins (MTs) merupakan kelompok protein pengikat logam yang kaya asam amino sistein, ditemukan pada bakteri, tumbuhan, invertebrata dan vertebrata. *Metallothionein* (MT) Pertama kali ditemukan oleh Margoshes dan Valle pada tahun 1957 sebagai protein pengikat kadmium (Cd) yang diisolasi dari gijal kuda. Para peneliti kemudian berlomba untuk mengetahui berbagai aspek tentang MT meliputi aspek fisika, kimia dan biokimia.

Peranan MT yaitu sebagai detoksifikasi logam berat dan pemeliharaan homeostasis ion logam intraseluler. Pada mamalia, MT

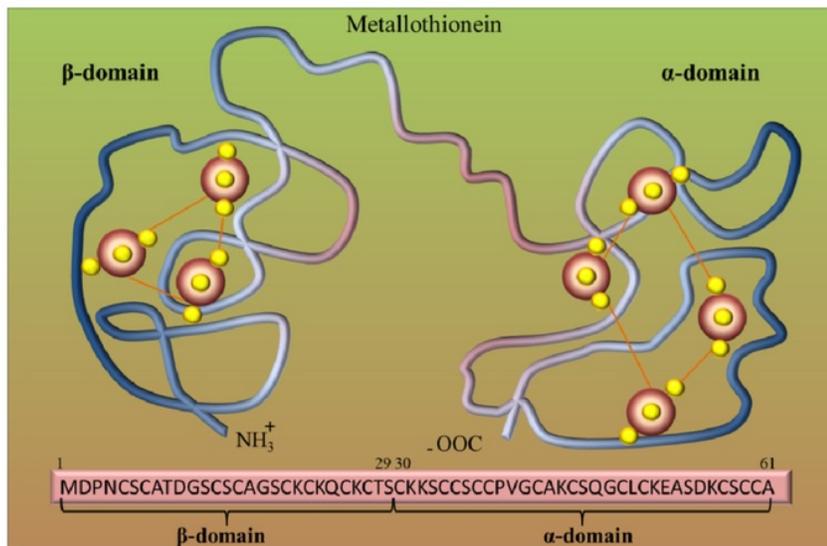
mengandung kira-kira 61-68 asam amino dimana 20 diantaranya merupakan asam amino sistein. Oleh karena itu MT sangat reaktif terhadap logam berat. Secara umum MT mengikat seng (Zn). Walaupun demikian, MT dapat berganti pengikatan terhadap logam berat jika kadar logam berat yang menggantikan lebih besar. Misalnya jika kadar tembaga (Cu) atau kadmium (Pb) lebih tinggi maka Zn dapat tergantikan oleh keduanya. Sel organisme yang mensintesis MT dalam jumlah besar memiliki ketahanan terhadap toksisitas Cd lebih tinggi dibandingkan sel dengan sintesis MT lebih rendah. Salah satu penelitian untuk membuktikan peranan MT dalam perlindungan terhadap toksisitas Cd adalah studi genetik menggunakan tikus transgenik atau *knockout*.

Berdasarkan model struktural dapat diasumsikan bahwa molekul MT tersusun dari 2 domain yang setiap domain memiliki gugus tiol/gugus sulfidril pengikat logam, yaitu domain α dan domain β (Gambar 1). Bagian N-terminal dari peptida tersebut ditetapkan sebagai domain β yang memiliki 3 ikatan ion divalen antara sistein dan logam, dan bagian C-terminal ditetapkan sebagai domain α yang memiliki kemampuan mengikat 4 ion divalen.

Metallothionein memiliki 4 isoform (MT-1, MT-2, MT-3 dan MT-4) dan 13 protein MT seperti protein pada manusia. Terbentuknya isoform berdasarkan perubahan bentuk yang berasal dari modifikasi MT setelah proses translasi, perubahan, perubahan kecil dari struktur primer, dan jenis ion logam yang diikat. Meskipun memiliki kesamaan bentuk fisika maupun kimia, MT memiliki perbedaan yang signifikan dalam hal letak dan peranannya bagi tubuh organisme. MT-1 dan MT-2 hampir dapat dijumpai pada semua jenis jaringan lunak. Adapun MT-3 terdapat di jaringan otak, hati, ginjal dan organ reproduksi.

Sedangkan MT-4 terdeteksi pada sel epitel skuamosa bertingkat, epitel mulut, kerongkongan, perut atas, ekor, alas kaki, dan kulit yang masih muda.

Pada manusia gen MT terletak pada kromosom ke-16, melibatkan 16 gen yang diidentifikasi dengan 5 diantaranya adalah pseudogen. MT-1 memiliki banyak sub tipe yang dikodekan oleh satu set 13 gen MT-1. Gen pada MT-1 yang dikenal aktif adalah MT-1A, 1B, 1E, 1F, 1G, 1H, 1M, dan 1X. Sementara yang termasuk pseudogen adalah MT-1C, 1D, 1I, 1J, dan 1L yang kesemua pseudogen tersebut tidak ditemukan pada manusia. Gen selanjutnya adalah MT-2, MT-3 dan MT-4.



Gambar 1. Struktur *metallothionein* (MT). Model dari 2 ikatan MT. Manik-manik besar merah adalah atom logam (misalnya Zn) dan manik-manik kecil kuning adalah atom belerang (S).

Struktur metallothionein (MT) terdiri atas:

1) *Thionein*

Satu diantara tiga struktur MT adalah protein. Protein pada MT banyak memiliki asam amino sistein dimana terdapat gugus

tiol/sulfidril. Protein dengan banyaknya gugus tersebut dinamakan *thionein*. *Metallothionein* yang tidak mengikat logam (Apo-MT) dalam sel manusia baru-baru ini dilaporkan memiliki jumlah yang sama dengan protein yang mengikat logam. Perhitungan protein bebas logam secara struktural dilakukan pada *demetallation* CdMT1a.

2) *Metalation*

Secara umum *metalation* adalah setiap reaksi kimia dimana atom hidrogen digantikan oleh salah satu logam. Thionein yang telah disintesis oleh ribosom akan mengikat logam secara spesifik sesuai isoformnya. Pengikatan terjadi pada gugus tiol/sulfidril (-SH). Sebuah penelitian melaporkan bahwa kemampuan pengikatan ion logam Zn dan Cd oleh MT-3 lebih lemah dibandingkan MT-2. Akan tetapi MT-3 memiliki kapasitas pengikatan yang lebih besar.

3) *Dimerization*

Dimerisasi merupakan penggabungan 2 molekul monomer membentuk dimer. Dimerisasi MT telah diamati oleh beberapa penulis dan sangat jelas dalam kerang laut yang terkena Cd. Pada mamalia domain terminal N bertanggung jawab terhadap pembentukan logam yang dijumpai dimer non-oksidatif, sedangkan dalam kondisi aerobik, sebuah disulfida antarmolekul spesifik terbentuk antara C terminal domain. Kedua dimer yang terbentuk memperlihatkan perbedaan tingkat kereaktifan terhadap radikal bebas.

2.2. Klasifikasi *Metallothionein*

Pengklasifikasian MT ke dalam famili, subfamili, subkelompok dan isoform didasarkan pada kesamaan sekuen dan hubungan filogenetik diantara mereka (Binz & Kagi, 1999). Fowler *et al.* (1987) membagi *metallothionein* menjadi 3 kelas:

1. Kelas I, terdiri dari semua MT protein yang memiliki lokasi sistein berhubungan dekat (mirip) dengan lokasi sistein pada mamalia. Beberapa MT pada moluska dan crustacea masuk dalam kelas ini, seperti remis/kerang, tiram, kepiting, dan lobster.
2. Kelas II, terdiri dari MTs protein yang tidak memiliki kesamaan dengan MT pada mamalia.
3. Kelas III, terdiri dari MTs non-protein yang dikenal juga dengan fitokelatin

Baru-baru ini, Binz dan Kägi(1999) mengajukan klasifikasi baru terhadap MT dengan memasukkan ciri-ciri filogenetik sebagai tambahan kriteria klasifikasi. Kelas I dan kelas II MT yang teridentifikasi, telah dibedakan menjadi 15 famili dari urutan hubungan evolusioner. Beberapa famili dicirikan oleh sebuah pola urutan khusus, jarak taksonomi, kumpulan ciri urutan umum yang didapatkan dari asam amino dan urutan polinukleotida dan jajaran urutan bertingkat atau pohon filogenetik. Beberapa famili MT ada pembagian lebih jauh menjadi beberapa subfamili yang dapat dipisahkan secara filogenetik dengan ciri struktur yang berbeda atau ciri genetik yang lain. Pada beberapa kasus khusus, berdasarkan pembagian filogenetik, subfamili dapat dibagi lagi menjadi subgrup, isoform terisolasi dan alel. Menurut sistem Binz and Kägi(1999), MT moluska termasuk dalam famili 2, sedangkan MT crustacea termasuk dalam famili 3.

MT mamalia merupakan polipeptida rantai tunggal yang terbentuk dari 61 sampai 68 residu asam amino. Jumlah dan posisi residu sistein pada semua spesies mamalia dan membentuk urutan $sis-x-sis$, $sis-x-y-sis$ dan $sis-sis$, dimana x dan y adalah asam amino selain sistein (Gambar 2). Logam divalen dikelilingi oleh atom sulfur pada gugus thiol dengan bentuk tetrahedral, sehingga tidak ada gugus

Berbeda dengan mamalia yang memiliki 2 isoform mayor (MT-1 dan Mt-2), beberapa spesies ikan hanya memiliki isoform MT tunggal. Akan tetapi pada ikan *tetraploid*, seperti *salmoid* (salmon dan trout) dan *cyprinids* (gurame dan ikan emas) nampak memiliki dua isoform MT (Chan, 1995). Kedua isoform ini terbentuk dari 60 asam amino yang terdiri dari 20 residu sistein, kebanyakan bermotif Sis-x-Sis dan Sis-Sis-x-x-Sis-Sis (Knapen *et al.*, 2005).

Penelitian pada MT moluska menunjukkan beberapa perbedaan, dibandingkan MT mamalia khususnya dalam jumlah sisteinnya. Sekuens MT oister (tiram) dan mussel (kerang) tergolong ke dalam kelompok MT kelas I. MT tiram menunjukkan kesamaan yang lebih besar dengan MT vertebrata dibandingkan dengan MT invertebrata. Semua sistein pada residu 27 pertama dari MT tiram memiliki bentuk yang sama dengan MT mamalia. Lebih jauh lagi 21 residu sistein disusun dalam bentuk 9 Sis-X-Sis, 5 Sis-Lis-Lis dan Sis-XX-Sis tunggal. Hasil komatografi MT keduanya, tiram dan kerang identik dalam komposisi asam amino (29% sistein, 16% glisin, dan 13% lisin) (Carpene, 1993).

Metallothionein crustacea memiliki panjang rantai peptida 58-59 asam amino, dengan 18 sistein per MT. Sekuens MT pada organisme kelompok *crustacea* menggambarkan kesamaan sekuens yang tinggi. Namun terdapat sedikit perbedaan salah satunya sebagai MT mengandung 2 triplet Sis dan menunjukkan struktur primer yang hampir identic (Serra-Batiste *et al.*, 2010).

Metallothionein pada kelompok spongia memiliki hubungan yang dekat dengan MT metazoa lain. perbedaannya terletak pada 2 aspek. Pertama, MT spongia lebih besar, 20 kDa, dibandingkan dengan MT lain (rata-rata 6-7 kDa). Kedua, MT spongia merepresentasikan sebuah duplikasi polipeptida yang terdiri dari 2 bagian yang berhubungan

dekat dengan MT metazoa. Beberapa penelitian menyatakan bahwa komposisi domain dan tingkat duplikasi domain pada genom sponsia sangat kompleks (Schroeder *et al.*, 2000).

2.3. Karakteristik Metallothionein

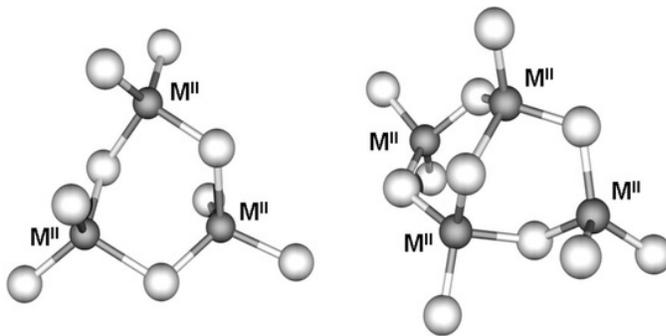
2.3.1. MT-1 dan MT-2

Semua vertebrata mengandung 4 isoform MT yang berbeda, yaitu MT-1, MT-2, MT-3 dan MT-4 (Moffatt & Denizeau, 1997). Pada rodentia, MT terletak pada kromosom nomor 8, sedangkan MT manusia dikendalikan oleh famili gen yang terletak di kromosom 16q13 dan dikodekan oleh famili multigen yang sedikitnya ada 12 gen terkait dengan berbagai pseudogen non-fungsional dan terproses (West *et al.*, 1990).

Pada mamalia 4 isoform MT (MT-1 sampai dengan MT-4) dan 13 MT seperti protein manusia telah diidentifikasi (Simpkins, 2000). Pada isoform MT-1, 11 gen (MT-1A, B, E, F, G, H, I, J, K, L dan X) telah ditemukan dimana 1 gen untuk setiap isoform (Ghoshal & Jacob, 2001). MT-1 dan MT-2 adalah isoform mayor atau isoform thionein yang paling banyak dalam jaringan mamalia. Sistein merupakan asam amino dengan gugus thiol (-SH) yang mampu membentuk kompleks logam 7 divalen seperti Zn dan Cd atau 12 ion logam monovalen (Nielson *et al.*, 2006). Gambar 4 menunjukkan struktur 9 sistein yang mengikat 3 logam divalen, dan 11 sistein yang mengikat 5 logam divalen melalui program PyMOL.

Ciri-ciri struktural dari MT mamalia yang sampai sekarang masih dilakukan penelitian spektroskopi. Keberadaan kelompok logam-tiolat di MT berasal dari penelitian resonansi magnetik nuklir (NMR) ^{113}Cd tentang ^{113}Cd -MT-2 (Otvos dan Armitage, 1980). Penelitian ini mengungkapkan bahwa 20 residu sistein dan 7 ion logam divalen

disekat antara dua kelompok logam-tiolat, membentuk seperti sikloheksana (Gambar 4). Kelompok pertama terdiri atas 3 logam ($M^{II}_3(Cys)_9$) dalam terminal N domain β (residu 1-30) dan kelompok selanjutnya terdiri atas 4 logam ($M^{II}_4(Cys)_{11}$) di terminal C domain α (residu 31-61). Dalam kelompok ini, ion-ion logam dikoordinasikan oleh kedua terminal dan jembatan tiolat μ_2 -ligand dalam bentuk tetrahedral simetri (Otvos dan Armitage, 1980, Vašák, 1980).



Gambar 4. Skema gambar dua kelompok logam-tiolat pada mamalia Zn_2Cd_5MT-2 (Robbins *et al.*, 1991). Atom logam (M^{II}) akan ditampilkan sebagai bulatan berbayang yang terhubung dengan atom belerang. Model yang dihasilkan dengan program PyMOL v0.99 (<http://www.delanoscientific.com/>) yang menggunakan Bank Data Protein (PDB) Koordinat $4mt2$.

MT-1 dan MT-2 pada mamalia memiliki kemampuan untuk membentuk agregat yang stabil baik dengan logam fisiologis atau senobiotik. Mereka dapat menunjukkan ekspresi logam terinduksi yang terjadi pada gen mereka. Kemampuan lain yang mereka miliki adalah dapat meningkatkan proses homeostasis, transportasi, dan detoksifikasi logam seperti peran biologis utama mereka (Tio *et al.*, 2004). Selain itu keduanya dapat meningkatkan penyerapan Zn melalui produksi *apometalloprotein* (apo-MT) secara temporer. Oleh karena itu, MT-1

dan MT-2 mamalia dapat bertindak sebagai penjaga dalam sintesis *metalloprotein* (Suhy *et al.*, 1999). Penelitian berkaitan dengan metabolisme Zn ini dilakukan menggunakan tikus transgenik. Induksi protein pada Zn diatur oleh MTF-1. Ketidakhadiran MTF-1 pada embrio dikarenakan adanya penghilangan secara sengaja saat proses transkripsi MT-1 dan MT-2 berlangsung, selain itu bisa disebabkan oleh pengurangan MTF-1 menggunakan enzim *glutamylcysteine sintetase*, sebuah enzim kunci dalam sintesis *glutathione*.

2.3.2. MT-3 dan MT-4

Beberapa penelitian pada protein MT telah dilakukan tanpa membedakan efek pada MT-1 dan MT-2. Antibodi MT (anti-MT) dalam penelitian imunohistokimia tidak membedakan dua isoform ini. Oleh karena itu, istilah MT sering digunakan sebagai istilah umum untuk MT-1 dan MT-2. Adapun MT-3 dan MT-4 adalah isoform minor yang umumnya ditemukan dalam sel khusus. MT-3 ditemukan dalam CNS yang memiliki efek unik pada penghambatan perkembangan neurit. Sebaliknya, MT-4 paling melimpah di jaringan tertentu. Ekspresi MT-3 pertama kali terdeteksi pada struktur tertentu dari tikus dan otak manusia, seperti neuron yang kaya akan Zn dan astrosit di korteks, hipokampus, dan amigdala (Ucida *et al.*, 1991; Palmiter, *et al.*, 1992). MT-3 diidentifikasi sebagai faktor penghambat pertumbuhan (GIF) atau faktor penghambat pertumbuhan saraf. MT-3 disintesis dalam jaringan saraf dan diatur pada pasien penyakit Alzheimer (Tsuji *et al.*, 1992; Aschner *et al.*, 1997).

Perbedaan antara MT-1 dan MT-2 dengan MT-3 adalah letak organ dan logam dan jenis logam yang terikat. MT-1 dan MT-2 pada mamalia diisolasi dari hati dan biasanya tersusun atas 7 logam Zn yang

divalent sedangkan MT-3 diisolasi dari otak manusia dan sapi yang mengandung 4 ion logam Cu yang divalen serta 3 atau 4 logam Zn yang divalen. Oleh karena itu, MT-3 menunjukkan adanya 2 *clusterhomometallic*, sebuah *cluster* Cu-tiolat dan Zn-tiolat (Bogumil *et al.*, 1998). Atas informasi inilah akhirnya dibuat kesepakatan oleh para ahli medis untuk menandai MT-3 sebagai isomer dalam organ otak sebagai target terapi penyakit neurodegeneratif (Hozumi *et al.*, 2004).

Bentuk terakhir yang diidentifikasi dari kelompok MT mamalia adalah MT-4 (*MetallothioneinA*). Isoform ini terdiri dari 62 asam amino, menyisipkan Glu di posisi 5 terhadap protein MT-1/MT-2. *MetallothioneinA* khusus terdapat di jaringan epitel skuamosa bertingkat. Terdapat berbagai informasi hasil penelitian oleh para ahli tentang MT-4. Informasi tersebut berkaitan dengan regulasi gen biologi, ekspresi molekuler dalam mamalia, perkembangan epitel dan fisiologi (Quaife *et al.*, 1994; Lian *et al.*, 1996, Schlake dan Boehm, 2001). Semua studi ini mengungkapkan bahwa MT-4 ini mengalami perkembangan yang pesat. Akan tetapi sebuah pertanyaan apakah MT-4 terlibat dalam metabolisme Cu atau Zn dalam epitel masih diperdebatkan sampai sekarang ini

Pengetahuan tentang fungsi protein yang sifatnya struktural semakin berkembang ⁵ karena perannya sebagai enzim, transporter, bagian membran sel, dan antibodi. Studi analisis menunjukkan kemampuan pengikatan logam Zn, Cd, dan Cu oleh MT-4 sangat tinggi (Tio *et al.*, 2004). Artinya ikatan logam dengan MT-4 dapat digantikan dengan logam lainya sewaktu-waktu dikarenakan tinginya afinitas logam terhadap gugus tiol pada MT-4. Peran khusus MT-4 dalam ilmu biologi adalah meregulasi Zn dalam keratinosit. Walaupun masih dalam studi

penelitian akan tetapi peran tersebut didukung oleh studi struktural pada Cd₇MT- dimana rata-rata afinitas pengikatan logam mengikat dua kelompok logam-tiolat di Cd₇MT-4 dan Cd₇MT-1/Cd₇MT-2. Dengan adanya kesamaan terhadap MT-1 dan MT-2 ini, MT-4 sangat dimungkinkan terlibat dalam metabolisme Zn dan metabolisme Cu di keratinosit.

Perbedaan MT-4 dengan MT-1 adalah bahwa MT-4 menunjukkan peningkatan preferensi untuk ion Cu monovalen daripada ion Zn divalen atau ion Cd. Keadaan ini berdasarkan sebuah penelitian yang membandingkan antara MT-4 dan MT-1 menggunakan tambahan media Zn⁻, Cd⁻, atau Cu⁻ secara *in vitro*. Analisis gen DNA *microarray* yang terlibat dalam diferensiasi epidermis tikus, MT-4 diidentifikasi sebagai target dari aktivator transkripsi WHN, dan ekspresinya terlihat pada epidermis skuamosa dan di seluruh jaringan epitel yang berkembang termasuk folikel rambut dan kulit punggung. Oleh karena itu, fungsi genomik tidak hanya menguatkan tetapi juga memperluas peran fisiologis MT-4 yang terlibat dalam transport atau pertukaran Zn pada diferensiasi epitel mamalia.

Secara keseluruhan, kemampuan pengikatan yang tinggi terhadap logam telah menjadikan MT sebagai biomarker terhadap lingkungan abiotik maupun biotik yang terpapar logam. Sejak MT diketahui hadir dalam sebagian besar jenis jaringan dan sel, MT kemudian dianggap sebagai protein "rumah tangga". Namun demikian, konsentrasi dalam sel dapat diubah pada berbagai kondisi fisiologis seperti perubahan konsentrasi hormon, faktor pertumbuhan serta akumulasi logam tertentu. Perubahan letak inti dan/atau sitoplasma selama proses proliferasi sel telah menunjukkan bahwa perubahan perubahan tingkat MT bisa diekspektasikan dalam berbagai situasi, seperti pertumbuhan

sel kanker yang tidak normal (Coyle *et al.*, 2002; Cherian *et al.*, 2003; Thirumoorthy *et al.*, 2007).

BAB III

PERAN DAN FUNGSI *METALLOTHIONEIN*

3.1. Peran Metallothionein

Metallothionein(MT) merupakan suatu protein yang berfungsi untuk mengikat logam berat yang masuk dalam tubuh. Protein sendiri merupakan suatu makromolekul yang sangat penting dalam kehidupan, antara lain karena peranannya sebagai enzim, transporter, bagian membran sel, dan antibodi. Kerusakan akibat keracunan logam berat dapat terjadi pada seluruh organ tubuh, menyebabkan berbagai macam penyakit yang berbahaya bagi pertumbuhan dan perkembangan anak.

Metallothionein merupakan suatu rantai polipeptida pendek, linier, terdiri dari 61-68 asam amino, kaya akan sistein (pada manusia terdiri dari 20 residu sistein), berbentuk menyerupai huruf S, dan memiliki kemampuan mengikat logam. Terdapat 4 bentuk MT dan setiap MT memiliki fungsi yang spesifik. Secara umum MT memiliki peranan dalam berbagai proses sebagai berikut (Moffatt, 1997; Simpkins, 2000).

- 1) regulasi kadar seng (Zn) dan tembaga (Cu) dalam darah
- 2) detoksifikasi air raksa (Hg) dan logam lain
- 3) perkembangan sistem imun
- 4) perkembangan sel otak
- 5) mencegah pertumbuhan bakteri berlebih dalam usus
- 6) produksi enzim pemecah kasein dan gluten
- 7) mengendalikan inflamasi pada saluran cerna
- 8) produksi asam lambung

- 9) perkembangan indera perasa pada epitel lidah
- 10) regulasi fungsi hippocampus dalam hal tingkah laku
- 11) perkembangan emosi dan sosialisasi

Metallothionein merupakan sistem utama yang dimiliki oleh tubuh dalam mendetoksifikasi air raksa (Hg), timbal (Pb), dan logam berat lain. Setiap logam berat memiliki afinitas yang berbeda terhadap MT. Berdasarkan afinitas tersebut, air raksa ternyata mempunyai afinitas yang paling kuat terhadap MT dibandingkan dengan logam lain seperti Cu, Cd, Ag, dan Zn. Bila MT berfungsi dengan baik dan/atau jumlah logam berat yang masuk tubuh tidak melebihi kemampuan MT untuk mengikat logam berat tersebut, maka seharusnya tidak akan menimbulkan gangguan akibat keracunan logam berat.

3.2. Fungsi *Metallothionein*

3.2.1. *Metallothionein* sebagai pembersih radikal bebas

Sebuah karya klasik Thornalley dan Vasak tentang aktivitas pembersihan MT terhadap radikal bebas hidroksil ($\cdot\text{OH}$) dan superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) yang dikeluarkan oleh *xantine/xantine oxidase* menghasilkan sebuah reaksi akumulasi oleh antioksidan MT terhadap radikal bebas melalui percobaan in vivo dan in vitro. Penelitian terkait kemampuan perlindungan MT terhadap radikal bebas juga telah dilakukan seperti penelitian tentang efek perlindungan MT terhadap radikal bebas pada sel epiteloma ikan emas (*Cyprinus carpio*). MT juga memiliki kemampuan untuk membersihkan metabolit oksigen reaktif (ROM) terutama hidroksil radikal.

Baru-baru ini sebuah percobaan in vitro dengan donor NO menunjukkan adanya reaksi antara NO dengan Cd₇MT1 membentuk S-nitrosothiol dalam domain β Cd₇MT1 tikus. NO sangat reaktif dan

mampu melepaskan Cd dari N-terminal domain β , sebaliknya kurang reaktif terhadap C-terminal domain α (Zangger *et al*, 2001). Jika Cd, MT1 reaktif pada satu domain, Zn, MT sangat reaktif untuk kedua domain. S-nitrosothiols efisien melepaskan zinc dari kedua domain α dan β Zn7MT-3. Tidak hanya MT1 saja yang reaktif terhadap NO, MT2 dan MT3 juga demikian. Namun dari ketiganya MT3 yang paling reaktif terhadap NO. Hal ini dapat kita tarik kesimpulan bahwa MT3 merupakan isoform MT yang memiliki kemampuan pembersih radikal bebas paling tinggi, khususnya terhadap NO.

3.2.2. *Metallothionein* sebagai Detoksifikasi logam dan homeostasis

Metallothionein dianggap sebagai protein yang terlibat dalam detoksifikasi kelebihan logam esensial maupun non esensial. Para ahli menyatakan pendapat ini berdasarkan hasil penelitian mereka terhadap berbagai isoform MT pada organisme seperti jamur, ikan, mamalia dan organisme lainnya. Sebuah isoform MT terbukti telah mengikat 12 ion Cu pada siput *Elix pomatia* di Romawi. Kadmium dalam tubuh Siput Elix dapat menjadi racun apabila kadar tersebut melampaui ambang batas yang telah ditetapkan. Peran MT disini adalah mengurangi kadar Cd tersebut sekaligus sebagai detoksifikasi racun Cd dalam tubuh siput.

Berkaitan dengan fungsi homeostasis adalah membatasi kelebihan logam dalam sel ataupun menambah logam yang seharusnya ada untuk mempertahankan kelangsungan metabolisme sel. Lalat *Drosophila melanogaster* memiliki 4 gen MT yang transkripsinya disebabkan oleh logam berat melalui faktor MTF-1. Keempat gen tersebut memperlihatkan fungsi yang berbeda, bahkan ada yang antagonis (berlawanan). Dengan adanya

fungsi yang bermacam-macam tersebut justru untuk mempertahankan homeostatis logam dalam sel serta pencegahan racun.

3.2.3. *Metallothionein* sebagai biomarker paparan logam berat

Metallothionein(MT) dapat berfungsi sebagai terhadap paparan logam berat. Sejauh ini, MT merupakan satu-satunya senyawa biologis dalam tubuh yang berinteraksi dengan logam secara alami sehingga sangat tepat jika dijadikan sebagai bioindikator atau biomarker. Penggunaan MT sebagai bioindikator juga digunakan untuk menilai paparan atau toksisitas kontaminan tertentu dari lingkungan yang ditandai dengan beberapa tropogenik dan stres alami organisme. Kemampuan MT dalam mengikat logam pertama kali dilaporkan lebih dari 50 tahun yang lalu sebagai protein yang dapat mengikat Cd, Cu, Zn yang bertanggung jawab terhadap akumulasi logam dalam ginjal kuda (Margoshes dan Vallee, 1957). Pasca ditemukannya MT tersebut banyak peneliti berlomba untuk meneliti lebih jauh termasuk diantaranya pengaplikasian MT terhadap organisme lainnya. Hasilnya lebih dari 50 invertebrata akuatik telah dilaporkan mensintesis MT di dalam tubuhnya. Ke lima puluh organisme tersebut berasal dari 5 filum dan 3/4 adalah filum moluska (Langston *et al.*, 1998).

Penggunaan organisme sebagai biomarker dikarenakan MT dalam tubuh organisme memegang peranan penting dalam pengelolaan mekanisme metabolisme dan transisi seluler materi logam didalam tubuh, terutama ion-ion logam berat (Binz 2000). Selain itu ekspresi MT umumnya meningkat dengan adanya pajanan logam Zn, Cu, Cd, Hg dan Ag (Viarengo *et al.*, 2000), serta toksitas seluler akan meningkat jika kecepatan masuknya logam ke dalam sel melebihi kecepatan sintesis MT. Dapat disimpulkan bahwa tingkat toksisitas

logam dalam sel dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu external (luar tubuh) dan internal (dalam tubuh).

Selain yang disebutkan di atas, MT dapat dijadikan sebagai parameter pada tingkat molekuler atau biokimia. Selain itu, pola isoform MT bisa memberikan informasi mengenai isoform berbeda yang disintesis dalam menanggapi logam yang berbeda atau bahan kimia (Dallinger, 1994). MT juga bisa dijadikan sebagai penanda indikasi yang potensial dari serangan karsinoma ductal pada dada, kulit, serviks dan pancreas, pertumbuhan sel yang tidak teratur, yang berkaitan dengan peningkatan proliferasi sel atau kerusakan sel hingga apoptosis.

3.2.4. *Metallothionein* sebagai pelindung keracunan kadmium (Cd)

Peran *metallothionein* sebagai pelindung racun Cd ditemukan melalui sebuah eksperimen yang membandingkan 2 jenis tikus. Sebelum dilakukan perlakuan (*treatment*) kedua kelompok tikus diberikan dosis Cd rendah. Hal luar biasa terjadi dimana kedua kelompok tikus toleran terhadap kematian. Setelah dosis Cd ditingkatkan, toleransi masih ditampakan oleh tikus *wild type* sementara tikus *MT-null* akhirnya mati. Hal ini menunjukkan peran penting MT sebagai protein utama yang melindungi keracunan Cd akut.

Keracunan Cd akut tidak lepas dari peran hati karena organ ini merupakan target utama dari racun termasuk Cd akut. Hepatoksitas Cd (keracunan hati oleh Cd) merupakan penyebab utama dari kematian akibat kontaminasi Cd. Kemampuan toleransi organisme terhadap hepatoksitas Cd akut bergantung kepada sintesis MT dalam hati. Semakin banyak MT yang dihasilkan maka semakin toleran organisme

tersebut terhadap Cd. *Metallothionein* pada hati berfungsi mengikat Cd didalam sitosol. Sebuah eksperimen menunjukkan tikus yang memiliki kandungan protein MT lebih tinggi toleran terhadap kematian dan hepatokisitas sedangkan tikus kekurangan protein MT menunjukkan gejala-gejala kepekaan terhadap Cd (4,6 mg / kg)dan terjadi cedera hati.

Selain berakibat kematian, dampak keracunan Cd tingkat akut adalah edema pulmonalis, pendarahan diikuti oleh peradangan, luka, perubahan *fibrotic*, dan karsinogenesis. Kesemua dampak tersebut diakibatkan oleh keracunan Cd tingkat akut berupa asap atau aerosol. Kadmium dalam dosis kecil dapat meningkatkan protein MT seperti misalnya peningkatan MT pulmo pada tikus pasca pemberian Cd dengan kadar yang telah diketahui sebelumnya. akan tetapi pemberian dosis Cd tinggi (65 nmoles in 50 μ l saline) dapat menjenuhkan MT endogen pulmonalis. Akibatnya terdapat kelebihan Cd bebas yang pada gilirannya nanti menghasilkan kerusakan pembuluh darah di paru-paru (Pearson *et al.* , 2003).

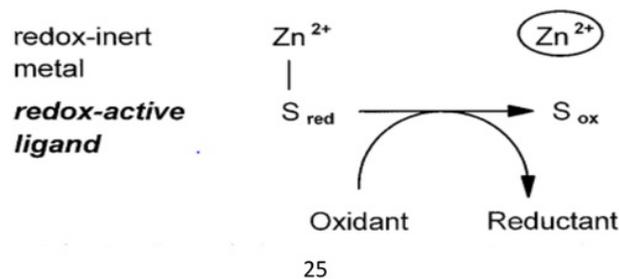
3.2.5. *Metallothionein* berkaitan dengan Karsinogenesis

Perkembangan karsinogenesis merupakan proses dinamis yang terjadi dalam iregulasi fungsi gen. dalam perkembangannya, tentunya dalam waktu yang tidak sebentar (beberapa tahun atau dekade) material genetik sel mengalami kerusakan yang disebabkan oleh substansi perusak, zat karsinogen, dll. Adanya akumulasi dari kerusakan yang terjadi menyebabkan perubahan fungsi gen dan perluasan mutasi sel. Tidak semua perluasan mutasi akan menjadi lebih buruk, melainkan sebagian dari mutasi yang telah mengalami kerusakan-kerusakan di awal menjadi tidak berkembang, tidak menjadi

lebih parah dan tidak lebih menyerang bahkan dapat menghilang secara tiba-tiba. Inilah salah satu fungsi MT berkaitan dengan perubahan karsinogenesis.

3.2.6. *Metallothionein* sebagai Fungsi Redoks

Hubungan Zn(seng) dengan ikatan S (sulfur) pada gugus tiol MT sangatlah kuat. *Metallothionein* memiliki 30% asam amino sistein pada sekuens polipeptidanya. Asam amino sistein ini memiliki sulfur yang sangat reaktif terhadap logam, sehingga terjadilah ikatan antara S dan logam Zn misalnya (bisa digantikan logam lainnya seperti Cd, Pb, Hg, Ag dan lain-lain). Peristiwa pengikatan logam Zn ini disebut sebagai sistem reduksi. Sebaliknya ketika ikatan antara S pada sistein dan Zn bertemu dengan atom O (oksigen) maka Zn akan lepas dari sistein dan digantikan oksigen. Peristiwa ini disebut dengan sistem oksidasi. Kedua sistem ini nanti saling bergantian berdasarkan keadaan di sekitar MT dan dikenal dengan sistem redoks (reduksi-oksidasi) (Gambar 5). Dengan demikian, MT dapat menjadi protein redoks, di mana kimia redoks bukan berasal dari atom logam melainkan dari lingkungan koordinasinya. Satu hal yang perlu dipahami adalah bahwa potensi terjadinya sistem redoks dari cluster ini sangat rendah (E_0 9, 2340 mV). *Metallothionein* lebih mudah untuk mengalami oksidasi oleh sejumlah oksidan selular dengan melepaskan logam seperti seng (Maret dan Vallee 1998).



Gambar 5. Ikatan Zn-S sebagai sebuah satuan redoks. Pelepasan ion Zn disebabkan oleh reaksi redoks antara Sulfur-sistein dengan oksidan. Mekanisme molekuler ini merupakan dasar dari hubungan antara Zn seluler dan redoks.

3.2.7. Fungsi Protektif dari *Metallothionein*

Metallothionein memiliki daya tarik ikatan yang kuat dengan ion logam bivalen. Beberapa penelitian telah membuktikan adanya MT atau meningkatnya sintesis MT dalam proses proliferasi cepat sel normal, regenerasi sel dan pada sel kanker. Penelitian tersebut mengungkapkan hubungan antara ekspresi yang berlebih dari protein MT dengan pertumbuhan sel neoplastik yang cepat. Berkaitan dengan kemampuan nukleofilik, MT bertugas dalam melindungi sel melawan efek sitotoksik dari obat anti kanker yang bersifat elektrofilik. Perlindungan/proteksi MT terhadap sel dari efek sitotoksik melalui perantara 1- β -D-arabinofuranosilsitosin dan faktor inti DF- α yang melibatkan mekanisme ikatan kovalen yang lebih kompleks..

3.2.8. Hubungan antara *Metallothionein* dan Apoptosis

Dalam beberapa penelitian terakhir dikemukakan bahwa ekspresi MT yang tinggi dalam sel dapat menimbulkan efek anti-apoptosis dan kekurangan MT pada sel (nol MT) dapat meningkatkan kerentanan sel apoptosis mati setelah mengkonsumsi obat anti kanker. Regulasi MT yang rendah pada antisens 18-mer dari sel MCF-7 tidak hanya menghambat pertumbuhan tetapi juga menginisiasi apoptosis.

TEKNIK ISOLASI *METALLOTHIONEIN*

4.1. Isolasi DNA Metallothionein

¹ DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan. DNA terdapat di dalam inti sel (nukleus), mitokondria, dan kloroplas. Ada perbedaan di antara ketiga lokasi DNA ini, DNA nukleus berbentuk linear dan berhubungan sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berhubungan dengan protein histon. DNA memiliki struktur helix utas ganda, yang mengandung 3 komponen utama yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan basa nitrogen (Faatih 2009). Setiap sel mengandung materi genetik DNA yang akan diturunkan pada keturunannya.

Isolasi DNA merupakan cara efektif untuk mempelajari DNA itu sendiri. ⁶ Isolasi DNA merupakan proses pemisahan molekul DNA dari molekul-molekul lain di inti sel. Prosedur ini memiliki beberapa tujuan analisis yaitu visualisasi DNA, peninjauan pola fragmentasi DNA, pembuatan pustaka genomik, rekayasa gen, dan amplifikasi DNA. Sementara prinsip utama isolasi DNA ada dua, sentrifugasi dan presipitasi. ¹ Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung. Teknik sentrifugasi ini dilakukan menggunakan mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan di bagian atas dan pelet di bagian bawah. Adapun presipitasi merupakan langkah yang dilakukan untuk

³²
mengendapkan protein histon sehingga untai-untai DNA tidak lagi menggulung.

Secara umum, tahapan-tahapan isolasi DNA adalah sebagai berikut.

1) Preparasi ekstrak DNA

Dalam preparasi ini dilakukan perusakan dinding sel (pada tumbuhan) menggunakan nitrogen cair kemudian digerus. Membran sel selanjutnya dirusak (lisis) sertadilakukan pengendapan polisakarida dan senyawa-senyawa fenolik menggunakan larutan detergen kationik yaitu bufer CTAB atau dapat menggunakan sodium dedosil sulfat (SDS). Bufer CTAB mengandung beberapa komponen meliputi Tris-Cl (denaturasi protein), EDTA (penghancur sel dengan mengikat ion Mg), NaCl (bahan penetral pada gula fosfat DNA), ⁶ CTAB, PVP dan merkaptoetanol (ketiganya untuk mendegradasi senyawa metabolit sekunder dan mengurangi *browning*).

2) Purifikasi DNA (pemurnian)

Purifikasi bertujuan untuk menghilangkan beberapa kontaminan seperti senyawa sekunder, polisakarida, RNA, dan protein. Denaturasi protein menggunakan senyawa kloroform isoamilalkohol dan CH_3COOH . Sedangkan lisis RNA dari ekstrak DNA menggunakan RNase.

3) Presipitasi DNA (pemekatan)

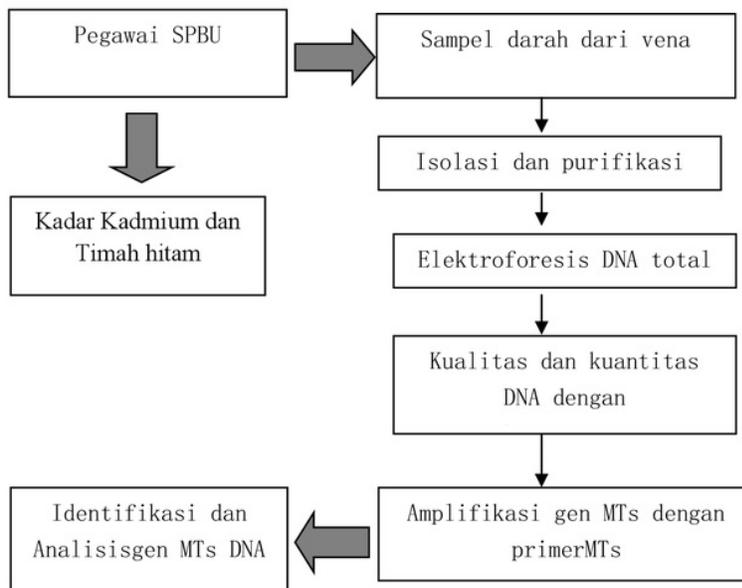
Presipitasi dilakukan agar DNA mengumpul atau mengendap dan memisahkannya dari garam-garam mineral sisa CTAB dengan menggunakan isopropanol dingin. Pelet hasil presipitasi akan dibersihkan oleh alkohol 70%. Tahapan presipitasi adalah tahapam paling penting untuk mengetahui tingkat keberhasilan sebuah isolasi DNA. jika terjadi kontaminasi pada tahap ini maka bisa dipastikan DNA yang dihasilkan

memiliki kualitas yang rendah sehingga akan mempengaruhi ketidakvalidan analisis data.

4.1.1. Isolasi DNA *Metallothionein* dari Darah

Isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan darah. Penggunaan darah untuk diisolasi DNA nya dikarenakan keberadaan kromosom dalam inti sel pada ⁵⁷eritrosit (sel darah merah) maupun leukosit (sel darah putih) misalnya pada darah kelompok aves. Adapun mamalia seperti manusia yang sel darah merahnya tak berinti dapat dilakukan isolasi DNA berdasarkan pada inti sel leukosit. Dari isolasi DNA ini nanti dapat diidentifikasi karakter *metallothionein*.

Kaitan DNA darah dengan MT adalah adanya akumulasi logam berat seperti Cd, Pb, Hg pada darah berbagai hewan bahkan manusia. Hasil penelitian menunjukkan pekerja SPBU yang sudah bekerja beberapa dekade mengalami peningkatan kadar Cd dalam darahnya yang berakibat terhadap kualitas dan kuantitas Gen MT. Oleh karena itu isolasi DNA sangat berkaitan dengan analisis analisis lebih dalam tentang MT dalam diri makhluk hidup. Adapun prosedur skema isolasi DNA darah sampai dengan identifikasi dan analisis gen MT dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Bagan alur isolasi DNA dan *metallothionein* pada darah pekerja SPBU

Teknik isolasi DNA darah memiliki berbagai prosedur bergantung kepada jenis spesies, tingkat kemurnian DNA, panjang DNA, kemampuan dipotong oleh enzim, dan kemampuan untuk tidak mengalami modifikasi selama proses isolasi berlangsung. Secara umum pada mamalia pengambilan darah dapat dilakukan melalui jarum suntik (seperti manusia), mata (tikus), dan lain sebagainya.

Adapun teknik isolasi DNA dari darah adalah sebagai berikut. Sampel darah 100 uL dalam tabung *vacuocyte* EDTA dimasukkan kedalam tabung effendorf dan dicampurkan dengan 300 uL Trizol (divortex 1-2 menit dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit). Penambahan 80 uL kloroform dan divortex 1 menit. Inkubasi pada suhu 4 °C dilanjutkan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Hasil sentrifugasi ini akan terbentuk 2 fraksi lapisan. Pengambilan 200 uL supernatan (cairan bening yang terletak dilapisan atas) dan

dimasukkan kedalam tabung effendorf baru yang berisi isopropanol. Tabung dibolak-balik (\pm 30 kali) agar campuran homogen selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dibuang, sementara pelt dicuci menggunakan 400 uL etanol 75% sebanyak 2 kali kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Setelah pencucian, etanol 75% dalam tabung dibuang. Hasil pelet kemudian dikeringkan pada suhu ruangan selama 5-10 menit. Setelah pelet kering ditambahkan dH₂O sebanyak 50 uL untuk melarutkan DNA.

4.1.2 Amplifikasi Gen MT-2A

Teknik amplifikasi DNA *in vitro* dilakukan menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang ditemukan pertama kali oleh Kary Mulis pada tahun 1985 (lihat Gambar 7). PCR sendiri merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Dengan metode PCR ini akan dihasilkan ribuan kali urutan DNA bahkan jutaan kali dari jumlah urutan semula. Pada setiap siklus PCR sebanyak n kali akan terbentuk DNA sebanyak 2ⁿ dari jumlah DNA awal. Jika terdapat 1 untai DNA yang akan diamplifikasi sebanyak 3 siklus maka akan terbentuk 2³=8 DNA. Jika yang akan dilakukan amplifikasi sebanyak 2 untai DNA dengan 3 siklus maka akan terbentuk 2 x 2³=16 DNA.

Dalam proses amplifikasi, terdapat 3 tahap utama yang harus dilalui untuk memperoleh hasil dengan kuantitas dan kualitas tinggi, yaitu 1) denaturasi DNA cetakan, 2) penempelan primer pada DNA cetakan (*annealing*) dan 3) pemanjangan DNA (*Extention*). Denaturasi merupakan pemisahan untai ganda DNA (*double strand*) menjadi untai tunggal (*single strand*). Denaturasi hanya dapat dilakukan dengan

memanaskan pada suhu 94-96°C. Pelepasan antara basa purin lebih lama diandingkan dengan basa pirimidin disebabkan lebih banyaknya ikatan yang terjadi pada basa purin. Pada tahap *annealing* primer menempel pada situs-situs utas tunggal yang komplemen dengan urutan primer. Terdapat 2 primer yakni primer *forward* (bergerak maju) dan primer *reverse* (bergerak balik). Pada tahap ini suhu akan menurun menjadi 54°C atau bergantung dengan kebutuhan khusus primer (karena setiap primer memiliki suhu khusus untuk dapat menempel pada situs DNA secara efektif). Pada tahap pemanjangan (*Extention*) DNA polimerase akan memperpanjang sekuen DNA. dNTPs akan menambah nukleotida sesuai dengan cetakan DNA. Ketiga tahapan ini akan terus berulang menghasilkan duplikasi sekuen DNA selektif dalam jumlah sesuai kebutuhan.



Sumber : <http://www.biocompare.com>

Gambar 7. Mesin PCR

Komponen-komponen utama yang harus disiapkan dalam proses amplifikasi menggunakan PCR ini ada 5 yaitu oligonukleotida primer (atau biasa disebut dengan primer saja), bufer amplifikasi, *deoxyribonucleosidetriphosphate* (dNTP), sekuen target (DNA templat) dan Taq DNA polimerase. Primer merupakan rantai DNA pendek, disebut juga oligonukleotida karena hanya memiliki beberapa nukleotida (18-30 basa). Peran primer sangat penting karena merupakan inisiator (pemula) dalam sintesis DNA menggunakan PCR. Selain itu primer juga

¹² berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA templat yang akan diamplifikasi dan penyedia gugus hidroksil (-OH) pada ujung 3' .
²⁶ Primer dengan panjang kurang dari 18 basa mengakibatkan berkurangnya spesifitas, keefektifan dan efisiensinya. Sedangkan ²⁶ primer lebih dari 30 basa tidak meningkatkan spesifitas sehingga hasilnya kurang optimal selain itu biaya yang dikeluarkan juga lebih mahal. Dari penjelasan tersebut menunjukkan bahwa kualitas primer sangat berpengaruh terhadap keberhasilan proses PCR.

Primer perlu dirancang komposisinya agar dapat bekerja secara optimal. Kandungan (G+C) primer sebaiknya ³¹ sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) pada DNA templat (target). Hal ini dikarenakan primer dengan kandungan (G+C) rendah akan sulit atau bahkan tidak mampu menempel pada tempat yang dituju dari DNA target. Urutan nukleotida juga perlu dirancang. Sebaiknya urutan nukleotida ²⁶ pada ujung 3' merupakan basa G atau C karena keduanya tidak toleran dengan adanya *mismatch* berkebalikan dengan kemampuan toleransi tinggi dari basa A dan T. Beberapa jenis primer yang dapat digunakan dalam proses *annealing* pada DNA gen Metallothionein diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer MT2A untuk amplifikasi gen *metallothionein*

| Nama Primer ³⁸ | F/R | Urutan basa nukleotida |
|----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| Primer MT2A-5A/G ³⁸ | <i>Forward</i> | 5' -GGCCGCCTTCAGGGAAGT-3' |
| | <i>Reverse</i> | 5' -GGACTTGAGGAGGCGTGGT-3' |
| Primer MT2A-209A/G ³⁸ | <i>Forward</i> | 5' -GGCTCAGGTTCCAGTACAGG-3' |
| | <i>Reverse</i> | 5' -AAGTCACTTGC GGCTCCA-3' |
| Primer MT2A +838 | <i>Forward</i> | 5' -CCGCTCCAGATGTAAAGAA-3' |
| | <i>Reverse</i> | 5' -GGCATATAAAGAAAACCAGAGACA-3' |

Komponen kedua adalah adanya bufer amplifikasi. Bufer ini digunakan untuk menentukan dan menstabilkan pH pada angka tertentu. Reaksi PCR sendiri berlangsung secara optimal pada pH tertentu. Bufer juga berfungsi sebagai kofaktor yang menstimulasi aktivitas DNA polimerasi. Fungsi ini berkaitan erat dengan keberadaan ion Mg^{2+} dalam bufer (berasal dari $MgCl_2$). Akan tetapi dalam beberapa kasus penambahan ion Mg^{2+} juga dilakukan untuk meningkatkan spesifitas DNA polimerasi dengan menambahkan larutan $MgCl_2$ secara terpisah.

Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) digunakan sebagai sumber nukleotida saat proses ekstensi (pemanjangan) menggunakan mesin PCR. dNTPs sendiri merupakan campuran dari berbagai nukleosida trifosfat yaitu dTP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Saat terjadinya ekstensi, dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' membentuk untai baru yang komplementer dengan DNA templat.

Taq DNA polimerase merupakan enzim yang berperan untuk mengkatalisis proses pemanjangan DNA (polimerasi DNA) baru oleh primer. Mengingat selama proses amplifikasi terdapat proses denaturasi dimana suhu yang diperlukan mencapai $95^{\circ}C$ maka enzim yang digunakan haruslah mampu bertahan pada suhu tersebut. Oleh karena itu enzim yang digunakan sebagai Taq DNA polimerase diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik. Salah satu enzim yang biasanya digunakan adalah enzim Taq polimerase yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim Pfu polimerase yang diisolasi dari bakteri *Pyrococcus furiosus*. Jika dibandingkan Pfu polimerase memiliki keunggulan aktivitas spesifik 10x lebih kuat dibandingkan Taq polimerase.

Di dalam laboratorium, selain primer dan DNA templat, biasanya ketiga komponen lainnya (dNTPs, DNA polimerase, dan bufer reaksi PCR) sudah disiapkan dalam reagen PCR-mix, sebuah paket/kit yang berisi bermacam-macam komponen, sehingga lebih memudahkan dalam persiapan proses amplifikasi mesin PCR. Persiapan lain yang perlu dilakukan adalah mengatur/menseting mesin PCR sebelum proses berlangsung dan menyiapkan alat-alat sebagai penunjang saat proses amplifikasi. Alat-alat tersebut seperti tabung effendorf dan mikropipet berbagai ukuran.

Proses amplifikasi menggunakan mesin PCR memiliki beberapa prosedur bergantung dari berbagai aspek. Perbedaan tersebut dikarenakan tingkat kekhususan perlakuan terhadap DNA templat terhadap primer. Adapun langkah-langkah proses amplifikasi gen MT-2A adalah sebagai berikut.

- 1) Tabung effendorf disterilkan dari berbagai kontaminan
- 2) Selanjutnya 12,5 uL HotStar MMX, 0,5 uL primer forward, 0,5 uL primer reverse, dan 6,5 uL *nuklease free water* dimasukkan ke dalam tabung effendorf tersebut
- 3) Penambahan ragen PCR-Mix ke dalam tabung effendorf kemudian dicampur sehingga homogen
- 4) Penambahan 5 uL DNA hasil ekstraksi yang mengandung gen MT-2A
- 5) Selanjutnya proses amplifikasi PCR dengan kondisi predenaturasi 95°C selama 15 menit, denaturasi 95 °C selama 1 menit, *annealing* 67 °C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 1 menit sebanyak 35 siklus dan dilanjutkan dengan ekstensi akhir 72 °C selama 15 menit.

4.1.3 Elektroforesis gel

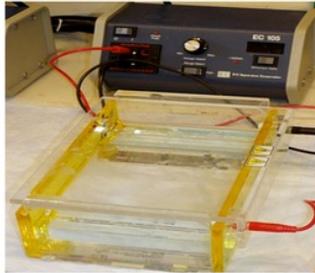
Hasil amplifikasi gen MT-2A menggunakan mesin PCR dapat divisualisasi menggunakan teknik elektroforesis. Elektroforesis merupakan pemisahan molekul-molekul zat berdasarkan perbedaan kemampuan migrasi dalam muatan listrik serta berat molekul itu sendiri. Gel sebagai media merupakan tempat migrasi molekul saat arus listrik dialirkan. ¹⁹ Molekul yang berukuran lebih kecil dan ringan akan lebih dahulu bermigrasi dibandingkan dengan yang lebih berat sehingga akan terjadi pemisahan.

Teknik elektroforesis yang sering digunakan adalah elektroforesis gel poliakrilamid (*polyacrylamide gel electrophoresis*) dan agarosa (Gambar 8). ⁵ Elektroforesis gel merupakan elektroforesis yang menggunakan gel sebagai fase diam untuk memisahkan molekul-molekul (Yepyhardi, 2009). Sebelum penggunaan gel poliakrilamid terlebih dahulu digunakan gel kanji ³² untuk memisahkan molekul yang lebih besar seperti protein. Namun pada perkembangannya gel poliakrilamid dan agarosa memiliki kelebihan dibandingkan kanji salah satunya untuk memisahkan molekul yang lebih kecil seperti DNA.

Teknik pemisahan molekul gen MT-2A menggunakan elektroforesis adalah sebagai berikut.

- 1) Bufer TAE 0,5 dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan gel agarose 2% ⁴ (agarosa 0,4 g dilarutkan ke dalam bufer TAE 0,5 mencapai volume 20 ml).
- 2) Larutan agarosa dipanaskan sampai homogen.
- 3) Baki agarosa disiapkan dan melekatkan selotip di tiap ujung baki gel agarosa sampai ⁴ tidak ada lubang pada masing-masing ujung baki.

- 4) Sisir elektrofoersis di pasang pada salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki.



Sumber : <http://www.wikipedia.org>

Gambar 8. Perangkat elektroforesis gel

- 5) Setelah temperatur larutan menurun ($50-60^{\circ}\text{C}$), ditambahkan $1\ \mu\text{l}$ ethidium bromida (sebaiknya menggunakan sarung tangan karena ethidium bromida bersifat karsinogenik).
- 6) Larutan dihomogenkan sebentar dan kemudian dituangkan ke dalam baki sampai larutan berubah menjadi gel padat.
- 7) Sisir elektroforesis diambil dengan hati-hati serta selotip dilepaskan dari ujung baki.
- 8) Baki yang telah berisi gel agarosa dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan bufer TAE 1x.
- 9) Produk PCR/sampel sebanyak $10\ \mu\text{l}$ dan $2\ \mu\text{l}$ loading dye dicampurkan secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa.
- 10) kabel sumber arus dihubungkan ke tangki elektroforesis (kabel kutub negatif berada dekat sumur).
- 11) Power supply dinyalakan pada voltase $100\ \text{volt}$ dengan waktu *running* selama 60 menit.
- 12) Proses *running* dijalankan dengan cara menekan tombol *run*.

- 13) Setelah selesai sumber arus listrik dimatikan kemudian baki diangkat dari tangki elektroforesis.
- 14) Gel dikeluarkan dan diletakkan di atas UV transluminator yang telah diselubungi kaca hitam di atasnya.
- 15) UV transluminator dinyalakan dan akan tampak pita-pita DNA.
- 16) Hasil positif gen MT-2A ditunjukkan dengan terbentuknya band sepanjang 214 bp.

Hasil isolasi dan purifikasi DNA serta elektroforesis dan PCR diperoleh gambar pita-pita DNA. Gambaran pita DNA pada manusia yang diduga terapar logam berat Pb dan Cd

4.2 Isolasi *Metallothionein* dari Organ Hati

Selain darah, isolasi DNA untuk mengetahui kualitas MT juga dapat dilakukan pada bagian lain dari makhluk hidup misalnya hati. Dewi (2014) ikan yang terpapar Cd di Kaligarang Semarang terbukti mensintesis MT-Cd. Hati merupakan salah satu organ pertama yang dilalui darah. Ikan yang hidup di daerah dengan tingkat kontaminasi logam berat di dalamnya berdampak terhadap akumulasi logam berat dalam tubuh ikan tersebut khususnya organ hati. Kontaminasi ini akan meningkat seiring dengan waktu dan kadar dosis logam berat di dalam perairan. George dan Olsson (1994) menyatakan umumnya tingkat MT dan logam yang tersebar akan meningkat sesuai dengan fungsi dosis yang diberikan. Oleh karena itu hati merupakan organ yang dapat dijadikan sebagai indikator kontaminasi sekaligus organ yang dapat diisolasi DNA nya untuk identifikasi MT.

Hati (*liver*) ikan berwarna coklat kemerahan terletak di dekat jantung di bawah gelembung renang dekat operkulum, pada area *finnapectoralis* dan *finnapevic*. Pengambilan hati ikan menggunakan

seperangkat alat bedah seperti pisau dan pinset. Berkaitan dengan teknik isolasi DNA hati ikan, terdapat beberapa macam protokol yang digunakan. Isolasi DNA hati ikan menurut Dewi (2014) adalah sebagai berikut. Hati ikan yang telah diambil selanjutnya ditambahkan bufer HCl pH 8 dengan perbandingan 1:5 (1 gram hati ikan dilarutkan dalam 5 ml buffer Tris HCl pH 8) menggunakan micropipet. Campuran kemudian digerus menggunakan mortar sampai terlihat homogen. Sampel yang homogen dimasukkan ke dalam *micotube* dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 *gravity* selama 15 menit. Hasil tahap ini akan terlihat 2 lapisan yang berwarna bening berada di atas dinamakan supernatan, dan lapisan bawah yang lebih gelap dinamakan pelet. Supernatan diambil menggunakan micropipet dan dipindah ke *micotube* baru. Sampel disimpan di dalam pendingin (*freezer*) pada suhu -20 °C sebelum dilakukan analisis selanjutnya.

4.3 Isolasi DNA *Metallothionein* Gonad Ikan

Gonad pada ikan berbentuk lonjong memanjang mengisi 2/3 rongga perut ikan. Gonad ikan jantan berwarna putih jernih sedangkan gonad betina berwarna kuning kecoklatan. Teknik isolasi DNA gonad kurang lebih hampir sama dengan teknik isolasi DNA pada hati ikan. Dari isolasi ini nanti selanjutnya untuk mengidentifikasi MT. Gonad ikan yang telah diambil ditambahkan bufer HCl pH 8 dengan perbandingan 1:5 (1 gram hati ikan dilarutkan dalam 5 ml buffer Tris HCl pH 8). Campuran kemudian digerus menggunakan mortar sampai terlihat homogen. Sampel yang homogen dimasukkan ke dalam *micotube* dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 *gravity* selama 15 menit. Hasil tahap ini akan terlihat 2 lapisan yang berwarna bening berada di atas dinamakan supernatan, dan lapisan bawah yang lebih

gelap dinamakan pelet. Supernatan diambil menggunakan micropipet dan dipindah ke *microtube* baru. Sampel disimpan di dalam pendingin (*freezer*) pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum dilakukan analisis selanjutnya.

4.4 Analisis ekspresi *metallothionein* dengan HPLC

Ekspresi *metallothionein* (MT) dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode analisis diantaranya yaitu analisis spektrofotometri, elektroforesis kapiler, elektrokimia, voltametri dan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dari kesemua metode analisis, HPLC memiliki keunggulan lebih besar dibandingkan lainnya. HPLC memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi terhadap perubahan ukuran partikel bahkan sampai tingkat molekuler. Selain itu dengan detektor sensitifnya, ia sangat efektif mengurangi waktu analisis pemisahan 20 kali lipat dibanding tanpa menggunakan HPLC. Beberapa peneliti yang menggunakan alat ini untuk mengidentifikasi MT adalah Chassaigne dan Ryszard (1999), Junko (1998) yang merekomendasikan HPLC anion kromatografi kolom, dan Chandrasekera dan Pathiratne (2008) yang menggunakan HPLC Bedicka. Mesin HPLC dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Perangkat *EZChrom Elite Jasco HPLC System*

Hasil ekspresi MT didapatkan dengan membandingkan larutan sampel (hati ika yang dibiakkan dalam keramba apung di sungai yang terkontaminasi logam berat Cd, Pb dan Hg) dengan larutan standar Cd, Pb dan Hg dengan panjang gelombang 154 nm. Jenis HPLC yang digunakan adalah *EZChrom Elite Jasco HPLC System* (UV2070-PU2080-LCnet II/ADC). fase diam berupa gel C-18 berdiameter 3,5 mikrometer dengan panjang kolom 4,5 x 150 mm sementara fase gerak menggunakan cairan asetonitril dan tris buffer HCl pH 8,1 dengan perbandingan 40:60 (v/v).

BAB V

MEKANISME BIODIRAMA METALLOTHIONEIN

5.1. Interaksi Metallothionin

Akhir-akhir ini telah diketahui bahwa ATP mengikat MT dalam ikatan konstan yang mencapai 175 $\mu\text{mol/L}$ pada pH 7,4 (Jiang *et al.* 1998b). Ikatan ini dapat diputuskan oleh modifikasi kimia dari delapan residu lisin MT yang dilestarikan. Hal ini menunjukkan bahwa modifikasi kimia dari delapan residu lisin dari MT sangat berpartisipasi dalam pemutusan ikatan konstan ini. Ikatan kimia antara MT dengan konsentrasi ATP seluler ini sangat jenuh yang ditunjukkan dengan adanya MT dalam sitosol sebagai MT/ ATP kompleks. Keberadaan MT dalam sitosol ini akan menghilangkan dua komponen yang sangat berpengaruh yaitu GSH dan ATP ketika MT tersebut dalam keadaan terisolasi. Fungsi dari ikatan ATP akan mengubah reaksi redoks dengan menunjukkan peningkatan laju reaksi sulfida. Sulfida

merupakan pengembangan dari seng transfer menjadi seng dehidrogenase sorbitol dan biasanya diubah dalam bentuk molekul. Berdasarkan pada eksperimen filtrasi gel, ATP mengubah bentuk MT yang semula berbentuk *dumb-bell* menjadi bentuk protein yang lebih bulat. Meskipun Brouwer *et al* (1993), menunjukkan bahwa GSH yang berikatan dengan N-terminal β -domain, kita dapat menunjukkan bahwa ATP berikatan dengan C-terminal α -domain. Kedua efektor tersebut dapat meningkatkan reaktivitas MT terhadap disulfida. Kami beranggapan bahwa GSH dan ATP kemungkinan akan menjadi dua substansi yang dibutuhkan untuk membuka domain sehingga atom seng akan dilepaskan dalam akseptor.

Pengikatan ATP terhadap MT bisa juga menjadi langkah perantara dalam pembentukan Zn-ATP kompleks menjadi kofaktor spesifik yang dibutuhkan oleh enzim tertentu. Dengan demikian, keduanya yaitu pyridoxal (PL) dan kinase dan flavokinase spesifik untuk Zn-ATP kompleks (Churchich *et al.* 1989, Nakano and McCormick 1991). Kedua enzim tersebut memberikan kofaktor khusus untuk prekursor vitamin dalam metabolisme energi.

5.2. Eksplikasi dan Implikasi

Protein seperti MT yang memiliki banyak gen dan regulator transkripsi memiliki fungsi yang sangat penting. Memang benar yang dikatakan oleh Uchida *et al* 199, bahwa MT-3 menjadi penghambat pertumbuhan saraf meskipun sejauh ini belum diketahui secara pasti fungsi MT-3. Sebuah sumber mengatakan bahwa fungsi dari MT adalah sebagai antioksidan dan berperan dalam detoksifikasi kadmium dan

merkuri. Akan tetapi, logam-logam yang dilepaskan oleh MT, seperti seng akan berbahaya terhadap logam dan oksidan dari sistem lain. Sifat gen yang dikeluarkan dari MT-1 dan MT-2 menunjukkan bahwa MT-1 dan MT-2 tidak diperlukan dalam pertumbuhan dan reproduksi seekor mencit (Masters *et al.* 1994, Michalska and Choo 1993) karena hewan transgenik tersebut mengalami obesitas ((Beattie *et al.* 1998). Interpretasi dari eksperimen fungsi MT masih dipertanyakan. Pada kenyataannya, pelajaran yang diperoleh dari penelitian ini adalah “*Biokimia dan Genetika diperlukan dalam menjelaskan fungsi Makromolekul*” (Palmiter 1998). Obesitas dari hewan transgenik menunjukkan bahwa ketiadaan MT akan berpengaruh sangat kuat dalam langkah-langkah pembentukan seng. Langkah-langkah ini akan berperan sebagai kontrol dalam metabolisme seluler. Dalam hal ini, MT bukan hanya berperan sebagai buffer melainkan sebuah rheostat ligand dan regulator redoks pada tingkat protein pada saat regulasi gen dan regulasi selama siklus sel berlangsung. Proses ini hanya membutuhkan substansi penting yaitu seng.

Identifikasi karakteristik fungsi protein khususnya MT/T berlahan-lahan sudah terungkap dan tantangan berikutnya adalah untuk mengetahui dan memahami sinyal-sinyal interaksinya. Dengan demikian, ada yang mengatakan bahwa oksidan digunakan dalam proliferasi sel, dimana dalam proses sintesis protein memerlukan seng (Burdon 1995), dan operasi akan dikurangi saat berada di sekitar lingkungan sitosol. Hal ini akan dicapai dengan kompartementalisasi reaksi redoks dan dengan menjaga pasangan redoks yang tingkat potensinya berbeda. Misalnya adalah $NAD^+/NADH$ dimana kurang lebih 105 kali lebih tinggi dari pasangan $NADP^+/NADPH$. Selanjutnya, kira-kira pada -394 mV dimana sudah dikurangi banyak daripada pasangan GSH/GSSG

dengan potensial -239 mV pada sitosol (rasio konsentrasi 100:1 dari 1 mmol/L total GSH) atau -165 mV pada retikulum endoplasma (rasio 3:1). Perubahan sangat kecil pada potensial pun akan sangat berpengaruh terhadap langkah-langkah biokimia. Dengan demikian, potensial dengan ukuran 72 mV lebih mengoksidasi beberapa pasangan GSH/GSSG, perbedaan potensial redoks antara proliferasi dan konfluen fibroblas dalam 34 mV. Beda potensial sekecil 15 mV dapat menghapuskan ikatan redoks dalam transkripsi DNA.

Dengan demikian, pertanyaan mengenai berkurangnya oksidasi seng dari sentral seng/ sulfur telah terjadi, tetapi kapan dan dimana proses ini terjadi belum diketahui. Oksidasi stres merupakan salah satu contoh ketidakseimbangan antioksidan yang menimbulkan gangguan homeostatik seluler pada seng dan mekanisme patofisiologi neurodegenerative serta penyakit-penyakit lainnya.

Seng pada sistem keseimbangan mempunyai 2 peran, yaitu katalis dan struktural. Kedua peran ini mengorganisasi protein subdomain untuk berinteraksi dengan DNA atau dengan protein. Melalui difraksi sinar X dan NMR spectroscopic, Albert menelaah koordinasi seng pada protein serta variabilitasnya. Motif koordinasi seng dapat diartikan bahwa karakteristik pengaturan jarak dari partikel asam amino ligan. Pada dekade terakhir ini difraksi sinar X dan NMR spectroscopic menjadi penemuan pertamanya yang kemudian didefinisi sebagai keluarga besar dari protein seng. Salah satu konsekuensi dari hal tersebut, angka protein seng meningkat sehingga minimal bisa mengenali satu taksiran konservatif dari beribu-ribu taksiran. Seng tersedia di dalam sel secara bebas dan tidak memiliki ion. Seng ini terikat kuat dengan protein dengan mengikat picomolar yang tetap dan pada konsentrasi bebas ion diharapkan berada didalam picomolar atau nanomolar.

Cara seng melepaskan dari distribusi situs pengikat pada protein dan distribusi seng mentransfer dari satu situs ke situs lainnya. Fungsi dari sepasang MT/T sebagai sistem keseimbangan seng. Panel kiri: terjadi peningkatan sejumlah seng yang dipengaruhi sintesis T melalui transkripsi faktor dan formasi MT. Panel

kanan : jika sejumlah seng tersedia rendah dan jika seng diperlukan apomorms protein seng, seng dilepaskan dari protein MT melalui mekanisme keseimbangan seng dan t terbentuk. Pemanfaatan seng harus diseimbangkan untuk menghalangi konsekuensi penyakit.

Percobaan yang akan dilakukan yaitu untuk membuktikan bahwa metallothionein (MT)³ / thionein (T) merupakan seperangkat biokimia yang mengontrol konsentrasi seng. Aktivasi elemen faktor transkripsi – mengikat logam – responsif menginduksi T ketika konsentrasi seng mencapai keadaan kritis, namun sejauh ini tidak terdefinisi, diikuti dengan penyerapan seng di MT. Berdasarkan keseluruhan seng mengikat mamalia MT pada pH 7 (Vasak dan Kagi 1994), MT mengikat seng lebih erat daripada kebanyakan protein seng lain dan termodinamika dasar khusus seng karena konsentrasi seng MT relatif tinggi dibandingkan dengan protein seng lain, seng terikat MT mewakili 5-10% dari total seng dalam hepatosit manusia. Akibatnya seng tidak dapat bergerak bebas dari situs pengikat ketat yang ada di MT, dari afinitas yang lebih rendah tanpa bantuan efektor yang mengikat pelepasan dan transfer. MT seng lebih cepat dalam reaksi intramolekul dan antarmolekul dengan ikatan seng lain meskipun stabilitas termodinamika ini relatif tinggi. Sistem MT/T mempunyai 2 fungsi yaitu menyerap seng (konsekuensi dari regulasi gen) dan melepaskan seng (saat membutuhkan sinyal).

⁶⁵Zn–MT digunakan untuk menyaring campuran biologi yang akan melepas Zn dari MT, sehingga diperoleh GSSG dan disulfida lain sebagai faktor pelepas. Adapun reaksi antara MT dan GSSG relative lambat ($k=5 \times 10^3/sM$ pada pH 8,6). Hipotesis yang dipakai bahwa mekanisme pelepasan suatu logam akan menyambung ke pengontrolan isi Zn di Mt ke keadaan reduksi GSH. Hal yang dipelajari yaitu hubungan dan transfer Zn dari MT ke kedua apoenzim dan pengaruh agen chromophoric Zn–chelating seperti 4-(2-piridylazo) resorsinol sebagai penerima Zn. Hubungan antara distribusi Zn dan reduksi GSH/GSSG bahwa distribusi Zn mungkin dikontrol oleh metabolisme perantara karena GSH/GSSG dikontrol oleh reduksi NADP⁺/NADPH menembus oksidasi glukosa di jalur pentose phospat. Enzim dengan sisi aktif disulfida bereaksi dengan MT dan melepas Zn. famili thiol/disulfida oksidoreduktase oksidan terhadap MT dan dapat menguntungkan interaksi spesifik MT atau distribusi Zn ke spesifik sinyal seluler. Hal ini

menunjukkan bahwa adanya aktivitas protein disulfida sebagai oksidan seluler, utamanya dalam sel bakteri.

Selenium diperlukan sebagai oksidan seluler thiol. Se dalam enzim GSH peroksidase, selenol dari sisi aktif selenosistein teroksidasi pertama kali oleh peroksidasi menjadi derivat asam selenic, kemudian menjadi oksidan untuk thiol GSH. Campuran Se mempunyai kemampuan untuk melepas Zn dari MT. Se mempunyai senyawa yang mirip GSH peroksidase, melepas Zn dari MT pada reaksi kedua yang diikuti 1:1 stoikiometri dengan respect ke thiol. Reaksi selenosistamin terjadi pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan sistamin. Interaksi antara Se dan Zn/S meningkatkan kemungkinan bahwa campuran Se dari molekul ringan atau Se sebagai komponen enzim yang mungkin memiliki aktivitas oksidan dari MT.

Induksi metallothionein (MT) secara khusus tergantung pada logam. Kehadiran respon elemen logam (MREs) dalam urutan gen metallothionein yang menunjukkan bukti spesifik logam yang terinduksi selama proses transkripsi metallothionein. Elemen logam yang baru nantinya akan mengikat protein untuk dimasukkan ke dalam faktor transkripsi logam 1 (MTF-1) yang berperan sebagai mediator positif untuk memulai adanya ekspresi gen metallothionein (MT). Faktor MTF-1 memerlukan konsentrasi peningkatan Zn selama DNA mengikat secara optimal. MTF-1 bagian protein Zn yang diperlukan adalah sebagai dasar dan ekspresi dari induksi berat logam MT. Selanjutnya, konstitutif aktif MTF-1 awalnya dihambat oleh inhibitor Zn sensitif yang diistilahkan dengan inhibitor transkripsi logam (MTI). Pada saat munculnya Zn, ion Zn terikat untuk mengikat bagian Zn sehingga pada saat pemisahan terjadi secara MTF-1/MTI kompleks. Kondisi ini memungkinkan MTF-1 untuk berinteraksi dengan MREs di promotor MT dan untuk selanjutnya mengaktifkan proses transkripsi MT. Lalu pengikatan MT baru yang nantinya akan disintesis untuk hasil Zn dalam memperbaiki MTF-1/MTI kompleks. Logam lain seperti Cd, Cu dan Hg, yang nantinya dapat menyebabkan MT untuk tidak mengaktifkan MREs secara langsung dan disarankan untuk mengikuti jalur yang mengalami hasil dalam peningkatan pada tingkat konsentrasi Zn bebas secara intraseluler. Contohnya saja seperti Cd, Cu dan Hg yang memiliki afinitas ligan yang lebih besar dari Zn dan untuk menggantikan Zn dari tempat pengikatan Zn dengan mengikat Zn lain melalui pertukaran reaksi logam-logam. Zn juga menggantikan untuk menyediakan pengikatan inhibitor, melepaskan hambatan dari faktor transkripsi dan

selanjutnya memulai adanya ekspresi MT. Selain itu, MRes dapat mampu berinteraksi dengan banyak protein, yang dapat mengatur ekspresi MT. Radikal bebas yang diproduksi dari bahan kimia dari berbagai pelarut organik seperti etanol, kloroform dan alkilasi yang juga dapat menginduksi ekspresi dari MT. MT memiliki peranan yang saat ini difokuskan pada kanker ogenesis dan mempunyai hubungan dengan adanya siklus sel kanker.

5.3. Metallothionein pada Manusia

Pemeriksaan sekuensing dilakukan untuk mengetahui lebih mendalam urutan gen metallothionein. Sekuen gen tersebut kemudian dibandingkan berdasarkan gen yang dikonfirmasi dari National Center for Biotechnology Information (NCBI Bethesda, MS, USA).

Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens sampel dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Metode Sekuensing dapat digunakan untuk mengidentifikasi sebuah mutasi gen dan dapat membandingkan gen homolog diantara spesies. Pada tahun 1977 metode sekuensing telah berkembang di Amerika yang dipelopori oleh Maxam and Gilbert dan pada tahun 1974 di Inggris oleh Sanger. Ada dua metode Sekuensing yaitu metode Maxam and Gilbert dan Sanger (Lilian *et al.* 2002).

Hasil sekuensing didapatkan dalam bentuk elektroforegram. Pada elektroforegram terdapat beberapa kurva dengan empat warna berbeda. Warna biru menunjukkan basa sitosin (C), warna hitam basa guanine (G), warna hijau basa adenin (A) dan warna merah basa Timin (T). Pembacaan elektroforegram didasarkan pada warna kurva yang membentuk puncak tertinggi. Jika terdapat satu kurva, maka diasumsikan bahwa pada posisi tersebut terdapat pasangan alel homozigot. Jika terdapat dua puncak kurva yang memiliki tinggi relatif sama, maka pada posisi tersebut diasumsikan pasangan alel heterozigot.

BAB VI

METALLOTHIONEIN SEBAGAI BIOMARKER

Literatur tentang sintesis metalonin pada berbagai macam spesies laut telah banyak dipelajari dan berkembang luas. Studi ini, penekanannya adalah pada ikan mas dan ikan nila serta manusia.

6.1 Analisis *metallothionein* Ikan

Metalotionin telah diidentifikasi sebagai peran utama dalam keseimbangan logam pada beberapa spesies ikan laut maupun ikan air tawar, termasuk salmoniformes, pleunectiformes, cypriniformes dan gadiformes. Sebagian besar bukti yang berdasar pada penelitian – penelitian sebelumnya menjabarkan bahwa umumnya tingkat metalotienin dan logam yang tersebar akan meningkat sesuai dengan fungsi dosis yang diberikan (George dan Olsson, 1994). Fakta bahwa baik ikan maupun invertebrata memiliki respon yang kompleks terhadap stres metal, yang mana didasarkan pada beberapa mekanisme detoksifikasi substrat, membuat ikan sama baiknya dengan invertebrata untuk menjadi perwakilan untuk monitoring berdasarkan pada determinasi metalotionin (Amiard et al, 2006).

Bagaimanapun juga, sebagian besar populasi asli ikan dianggap kurang tepat mewakili indikator biologis lingkungan yang terkontaminasi dibandingkan dengan beberapa jenis invertebrata karena pergerakan mereka yang menandakan bahwa ikan tidak memenuhi kriteria yang tepat sebagai indikator yang baik pada ekosistem (Langston et al., 2002). Ada pula variasi dari kondisi-kondisi lain, selain logam yang berpotensi dapat menghasilkan pada induksi metalotionin di ikan. Telah dianjurkan, sebagai contoh konsentrasi basal dari metalotioni pada beberapa

spesies ikan berbeda dengan waktu tahun, wilayah reproduksi, suhu air dan wilayah pertumbuhan (Duquesne, 1992; Hamzchaffai et al., 1995)

Hasil ekspresi MT didapatkan dengan membandingkan larutan sampel (hati ikan yang dibiakkan dalam keramba apung di sungai yang terkontaminasi logam berat Cd, Pb dan Hg) dengan larutan standar Cd, Pb dan Hg dengan panjang gelombang 154 nm. Jenis HPLC yang digunakan adalah *EZChrom Elite Jasco HPLC System* (UV2070-PU2080-LCnet II/ADC). fase diam berupa gel C-18 berdiameter 3,5 mikrometer dengan panjang kolom 4,5 x 150 mm sementara fase gerak menggunakan cairan asetonitril dan tris buffer HCl pH 8,1 dengan perbandingan 40:60 (v/v).

6.2 Analisis ekspresi *metallothionein* Pada Manusia

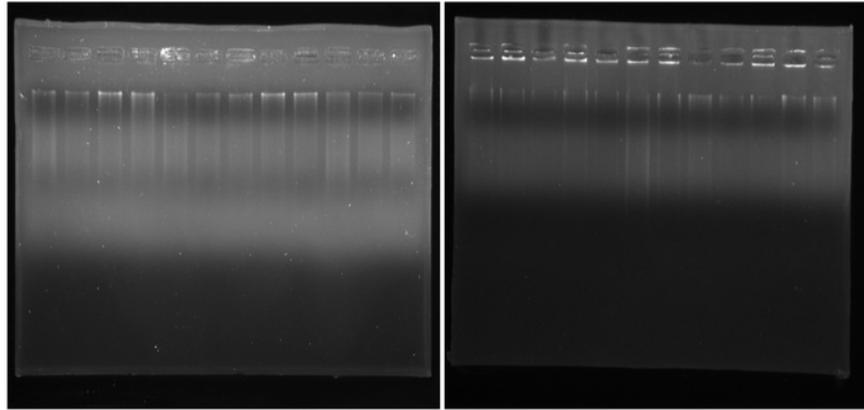
Dewi (2015) dalam penelitiannya terhadap 52 pekerja SPBU di wilayah Semarang Barat, Semarang Timur dan Semarang Selatan yang diambil darahnya menunjukkan hasil adanya akumulasi logam Pb di dalam darahnya (Tabel 2) kadar Pb rata-rata di dalam darah pekerja sebesar 14,23 $\mu\text{g/dL}$ dengan simpang baku 2,54 $\mu\text{g/dL}$. Kadar Pb tertinggi 30,62 $\mu\text{g/dL}$ dan terendah 5,28 $\mu\text{g/dL}$. Batas maksimal kadar Pb dalam darah menurut WHO (1995) adalah 25 $\mu\text{g/dL}$. Berdasarkan kriteria tersebut maka 59,6% responden mempunyai kadar Pb darah sedang (10 - 25 $\mu\text{g/dL}$) yang masih dalam batas kriteria normal, 32,7% mempunyai kadar timbal rendah (< 10 $\mu\text{g/dL}$) dan 7,7% atau 4 responden mempunyai kadar timbal tinggi (> 25 $\mu\text{g/dL}$). Adapun hasil pemeriksaan kadar kadmium darah perugas SPBU rata-rata 3,22 $\mu\text{g/dL}$ dengan simpangan baku 5,24 $\mu\text{g/dL}$. Kadar kadmium tertinggi 22,43 $\mu\text{g/dL}$ dan terendah 2,15 $\mu\text{g/dL}$.

Tabel 2. Distribusi frekuensi kadar timbal dalam darah Pekerja SPBU Kota Semarang

| Kadar timbal | Frekuensi | Persentase (%) |
|----------------------------------|-----------|----------------|
| Rendah (< 10 $\mu\text{g/dL}$) | 17 | 32,7 |
| Sedang (10-25 $\mu\text{g/dL}$) | 31 | 59,6 |
| Tinggi (>25 $\mu\text{g/dL}$) | 4 | 7,7 |
| Total | 52 | 100 |

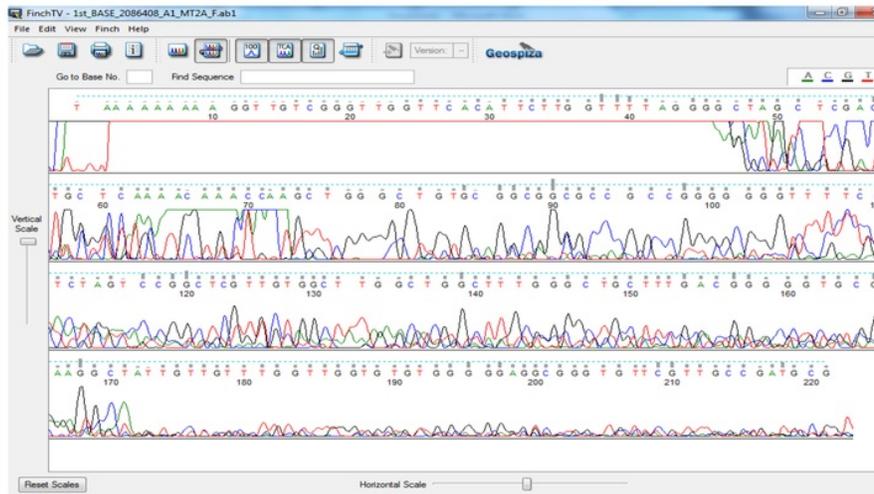
Akumulasi logam berat Pb dalam darah pekerja SPBU diakibatkan oleh berbagai hal. Salah satu penyebab akumulasi ini adalah lingkungan sekitar pekerja tercemar oleh logam berat dan terjadi proses inhalasi secara terus-menerus. Dewi (2015) mendukung penelitiannya dengan membandingkan kadar Pb dan Cd udara yang telah dilakukan oleh Badan Lingkungan Hidup Kota Semarang. Kadar Pb udara di salah satu SPBU wilayah Semarang Barat sebesar $0,061 \mu\text{g/m}^3$. Kadar Pb udara di salah satu SPBU wilayah Semarang Timur sebesar $0,056 \mu\text{g/m}^3$. Kadar Pb udara di salah satu SPBU wilayah Semarang Selatan sebesar $0,035 \mu\text{g/m}^3$. Sedangkan kadar Pb udara di salah satu SPBU wilayah Gunungpati sebesar $0,020 \mu\text{g/m}^3$.

Sebagian sampel darah dilakukan uji lanjut berupa isolasi dan purifikasi DNA dilanjutkan elektroforesis dan PCR diperoleh hasil seperti pada Gambar 10.

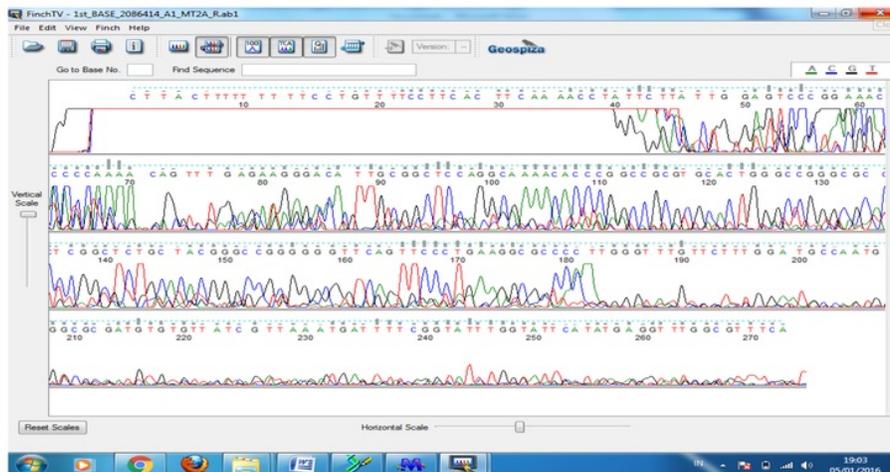


Gambar 10. Hasil isolasi dan purifikasi DNA sampel darah manusia

Teknik sekuensing dilakukan setelah diketahui adanya ekspresi metallothionein. Dewi (2015) melakukan sekuensing terhadap 6 darah pegawai SPBU yang mengakulasi logam Pb dan Cd. Hasil yang ditunjukkan adalah pekerja tersebut mensintesis Metallothionein di dalam darahnya. Sekuensing dilakukan dengan bantuan Laboratorium PT. Genetika Science Indonesias. Pemeriksaan sekuensing dilakukan untuk mengetahui lebih mendalam urutan gen MT pada pekerja pompa bensin. Sekuen gen tersebut kemudian dibandingkan berdasarkan gen yang dikonfirmasi dari National Center for Biotechnology Information (NCBI Bethesda, MS, USA). Hasil sekuensing MT-2A dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Hasil sekuensing sampel A1 MT-2A darah pekerja SPBU Kota Semaang



Gambar 12. Hasil sekuensing sampel A2 MT-2A darah pekerja SPBU Kota Semaang

Hasil sekuensing pada gambar 11 dan 12 berupa elektroforegram. Pada elektroforegram tersebut terdapat beberapa kurva dengan empat warna berbeda. Warna biru menunjukkan basa sitosin (C), warna hitam

basa guanine (G), warna hijau basa adenin (A) dan warna merah basa Timin (T). Pembacaan elektroforegram didasarkan pada warna kurva yang membentuk puncak tertinggi. Jika terdapat satu kurva, maka diasumsikan bahwa pada posisi tersebut terdapat pasangan alel homozigot. Jika terdapat dua puncak kurva yang memiliki tinggi relatif sama, maka pada posisi tersebut diasumsikan pasangan alel heterozigot.

Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basanukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens sampel dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Metode Sekuensing dapat digunakan untuk mengidentifikasi sebuah mutasi gen dan dapat membandingkan gen homolog diantara spesies. Pada tahun 1977 metode sekuensing telah berkembang di Amerika yang dipelopori oleh Maxam and Gilbert dan pada tahun 1974 di Inggris oleh Sanger. Ada dua metode Sekuensing yaitu metode Maxam and Gilbert dan Sanger (Lilian *et al.* 2002).

Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida dalam bentuk ABI *file* selanjutnya dilakukan pengeditan dalam program Bio edit versi 7.0.9. Pengeditan dilakukan untuk menghilangkan basa yang tidak perlu dengan membandingkan sekuens dengan kromatogram. Hasil sekuensing bentuk Abi *file* dapat dilihat pada Gambar 13.

```

1 AAGCAGCATTCCCAAGTCCCGCTTTCACCCGCGCTAACGGCTCAGGTTTCGAGTACAGG
.....
.....
R                                     ** S Y K
61 ACAGGAGGGAGGGGAGCTGTGCACACGCGGAGGCGCACGGCGTGGGCACCCAGCACCCG

```

```

.....
.....
                                Y Y      M R
121 GTACACTGTGTCCTCCCGCTGCACCCAGCCCCTCCGCGCCGAGGCGTCCCGAGGCGCA
.....
.....

K                                S      R      K      R
181 AGTGGGCCGCCTTCAGGGAAGTGCACCCGCGCCCGTGTGCAGAGCCGGTGCGCCG
.....
.....

                                R      K      MS      R
241 GCCCAGTGCAGCGCGGCCCGGTGTTTCGCCTGGAGCCGCAAGTACTCAGCGCGGGGCGTG
.....
.....

301 TGCAGGCAGCGCCCGCGGGGCGGGGCTTTGCACTCGTCCCGGCTCTTTCTAGCTATA
.....
.....

M  S      R      Y KK      R      S  YV
361 AACACTGCTTGCCGCGCTGCACTCCACCACGCCTCCTCCAAGTCCCAGCGAACCCGCTG
.....
.....

R      R  K      S      R      R      *  *
421 CAACCTGTCCCGACTCTAGCCGCTCTTCAGCTCGCCAATGGATCCCAACTGCTCCTGCGC
.....
.....
ATGGATCCCAACTGCTCCTGCGC
.....
-M--D--P--N--C--S--C--A

*      Y  W*  Y  Y  Y      S      Y
481 CGCCGTGACTCTGCACTGGCGGGCTCCTGCAAATGCAAAGAGTGCAAATGCACCTC
24  CGCCGGTGACTCCTGCACCTGCGCCGGCTCCTGCAAATGCAAAGAGTGCAAATGCACCTC
8  --A--G--D--S--C--T--C--A--G--S--C--K--C--K--E--C--K--C--T--S

RR  ** *  RY YY  Y      DY  Y      R
541 CTGCAAGAAAAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCTGTGGGCTGTGCCAAGTGTGCCAGGGCTG
84  CTGCAAGAAAAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCTGTGGGCTGTGCCAAGTGTGCCAGGGCTG

```

```

      16
28  --C--K--K--S--C--C--S--C--C--P--V--G--C--A--K--C--A--Q--G--C

      *  K  Y      S  RY  Y  R      *  W  D      Y  Y
601  CATCTGCAAGGGGCGTCGGACAAGTGCAGCTGCTGCGCCTGATGCTGGGACAGCCCGC
144  CATCTGCAAAGGGGCGTCGGACAAGTGCAGCTGCTGCGCCTGA.....
48  --I--C--K--G--A--S--D--K--C--S--C--C--A--*.....

      W  Y  S  M      M      Y  **      S      S
661  TCCCAGATGTAAAGAACGCGACTTCCACAAACCTGGATTTTTTATGTACAACCCTGACCG
.....
.....

                                  R  W
721  TGACC GTT GCTATATTCCTTTTCTATGAAATAATGTGAATGATAATAAACAGCTTTG
.....
.....

M
781  ACTTGA
.....
.....

```

Gambar 13. Hasil sekuensing bentuk *Abi file*

Pengeditan selanjutnya dilakukan dengan membandingkan alignment dalam *Clustal W*. Hasil yang didapatkan adalah urutan basa nukleotida MT-2A pada urutan basa ke-388 dan 608. Sekuen yang telah dilakukan pengeditan dimasukkan dalam BLAST NCBI untuk mengetahui homologi sekuen sampel dengan spesies terdekat dari koleksi GenBank. Dewi (2015) mengemukakan hasil BLAST dari sekuen yang diperoleh menunjukkan nilai homologi yaitu 96. Perbedaan nukleotida diantara *MT-2A* digambarkan melalui sekuen nukleotida hasil alignment BLAST.

Hasil alignment asam amino ² memperlihatkan adanya kesamaan susunan asam amino penyusun gen MT-2A antara sampel dengan sampel ² lainnya yang ada di Genbank. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa sekalipun pada tingkat nukleotida terlihat adanya mutasi (transisi

maupun tranvers. Akan tetapi mutasi yang terjadi hanya bersifat mutasi *silent* yakni mutasi pada nukleotida yang tidak menimbulkan perubahan asam amino. Mutasi ini tidak mengubah fungsi dari gen sitokrom oksidase I (Zein & Prawiradilaga 2013). Kodon dengan pola seperti itu, menurut Dale dan Park (2004) dikenal dengan istilah *synonymous codons*. Zhang *et al.* (2010) menambahkan bahwa karakteristik lain mtDNA terdapat pada prosentase kandungan basa.

Pada manusia, MTs dikodekan oleh sekelompok gen yang terletak pada kromosom 16q13 yang terdiri dari sepuluh isoform MT fungsional. Protein yang dikodekan dibagi menjadi empat kelompok: MT1, MT2, MT3 dan MT4 protein. Isoform MT manusia memiliki pola ekspresi spesifik jaringan. Ekspresi MTs meningkatkan dalam menanggapi berbagai induser seperti logam, interleukin, interferon, tumor necrosis factor alpha dan hormon glukokortikoid.

BAB VII

PENUTUP

Proses pemantauan penanda biologi (biomarker) dan polusi logam (metal) biasanya digunakan untuk memantau paparan logam berat baik di udara maupun di daerah perairan. Monitoring ini digunakan untuk mencatat konsentrasi total (dan belum tentu bioavailable) dari sebagian rentang kecil polutan dalam matrik yang berbeda pada lingkungan yang diberikan. Pemantauan ini merupakan cara yang lebih modern dibandingkan dengan yang lain. Melalui pemantauan dengan biomarker dapat diketahui status kesehatan suatu lingkungan dan dapat digunakan untuk mengukur indeks respon terpadu.

Analisa secara kimia menunjukkan hanya ada bahan polusi (polutan) dengan konsentrasi tunggal di lingkungan, sementara indeks biomarker yang terintegrasi juga menunjukkan kemampuan bioavailabilitas dan interaksi serta pengaruh gabungan dengan memperhatikan banyak faktor karakteristik lingkungan.

Biomarker dapat diartikan sebagai suatu respon biologi terhadap kondisi lingkungan kimia pada tingkat individu atau menunjukkan rendahnya respon awal dari status normal. Jadi biomarker ini dapat diamati pada individu dengan memperhatikan gejala-gejala biologi apa yang muncul pada individu akibat dari polutan yang ada di lingkungan. Proses pada manusia dapat diamati melalui pengujian dengan sampel darah atau urinenya. Jadi melalui pengamatan secara biokimia, fisiologi, histologi, morfologi, dan perilaku dapat dijadikan sebagai biomarker.

Biomarker sendiri dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu biomarker *eksposure* dan efek biomarker. Biomarker *eksposure* berkaitan erat dengan kegiatan pembongkaran. Namun pengertian pembongkaran di sini bukan berarti pengaruh polutan yang merugikan. Sedangkan efek biomarker lebih mengarah kepada pengaruh yang merugikan pada organisme. Contohnya pada uji kadar logam di lingkungan laut Inggris.

Biomarker dianggap sebagai sinyal peringatan pertama pada individu karena pada tingkat molekul pengaruh polutan hanya pada ambang batas yang kurang

beracun daripada apabila kita memantau perubahan pada tingkat spesies, populasi, atau masyarakat.

Berdasarkan hasil BLAST dari sekuen yang diperoleh menunjukkan nilai homologi yaitu 96% pada gen MT-2A dengan GenBank Acc Number GQ154088.1. Perbedaan nukleotida diantara *MT-2A* digambarkan melalui sekuen nukleotida hasil alignment BLAST. Sehingga dapat dikatakan bahwa gen MT-2A pada pekerja pompa bensin adalah mirip dengan Gen Bank, yang mana merupakan sekuen gen MT-2A normal tanpa paparan. Kemiripannya sekitar 96% atau mendekati mendekati 100%. Dengan demikian gen MT-2A tidak dapat digunakan sebagai biomarker deteksi dini untuk mengetahui adanya kerentanan terhadap paparan logam berat Pb dan Cd.

Hasil alignment asam amino pada memperlihatkan adanya kesamaan susunan asam amino penyusun gen MT-2A antara sampel dengan sampel lainnya yang ada di Genbank. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa sekalipun pada tingkat nukleotida terlihat adanya mutasi (transisi maupun tranversi), namun mutasi yang terjadi hanya bersifat mutasi *silent* yakni mutasi pada nukleotida yang tidak menimbulkan perubahan asam amino, sehingga tidak mengubah fungsi dari gen sitokrom oksidase I (Zein & Prawiradilaga 2013). Kodon dengan pola seperti itu, menurut Dale dan Park (2004) dikenal dengan istilah *synonymous codons*. Zhang *et al.* (2010) menambahkan bahwa karakteristik lain mtDNA terdapat pada prosentase kandungan basa.

Pada manusia, MTs dikodekan oleh sekelompok gen yang terletak pada kromosom 16q13 yang terdiri dari sepuluh isoform MT fungsional. Protein yang dikodekan dibagi menjadi empat kelompok: MT1, MT2, MT3 dan MT4 protein. Isoform MT manusia memiliki pola ekspresi spesifik jaringan. Ekspresi MTs meningkatkan dalam menanggapi berbagai induser seperti logam, interleukin, interferon, tumor necrosis factor alpha dan hormon glukokortikoid

DAFTAR PUSTAKA

- 8
Amiard J.C., Amiard T.C, Barka S., Pellerin J, Rainbow P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76:160–202
- 22
Aravind P. and Prasad M.N.V. 2005. Zinc mediated protection to the conformation of carbonic anhydrase in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum L.* *Plant Science*, 169: 245-254
- 10
Argawala, S.P. 2006. *Environmental Studies*. Narosa Publishing House PVT. LTD. New Delhi Chennai Mumbai Kolkata.
- 14
Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 62, pp.42–52.
- 47
Arnold H, Pluta HJ, Braunbeck T. 1995. Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in-vivo-ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 33:17–43
- 54
Arnold, B.S., Jagoe, CH, Gross, T.S., Howerth, EW, Reinert, R.E. 2000. *Effect of Low Levels of Methyl Mercury on The Development of Gonads in The Nile Tilapia*. Presented at the 20th annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia.
- 35
Aziz, S. H. A. dan Ghazaly N.E.L. 2006. Effect Of Pollutants in Coastal Water Of Jeddah on 2-The Histological Structure Of Liver Of The Fish *Saiganus rivulatus*. Saudi Arabia. *Egyptian Journal Of Aquatic Research* 1687-4285 Vol. 32 No.1, 2006:316-333.
- 21
Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132, 85–98.
- 45
Campagne MV, Thibodeaux H, Van Bruggen N, Cairns B, Lowe DG. 2000. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*, 15, 5200-5207.
- 8
Carajaville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, VC., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Carpene E, G. Andreani & G. Isani. 2007. Metallothionein Function and Structural Characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21:35-39.

- Ch`evre, N., Gagn`e, F., Gagnon, P., Blaise, C., 2003. Application of rough sites analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* 51, 13–23.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182.
- Choirudin dan Indrajid (2007). *Eceng Gondok Penyerap Logam Berat Cd di Sungai Kaligarang Semarang*. Makalah Olimpiade Science Tingkat Internasional di Turki, SMA Semesta Semarang.
- Dewi.N.K., Purwanto, Henna Rya Sunoko 2010. *Biomarker Pada Ikan Sebagai Biomonitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium di Perairan Kaligarang Semarang*. Laporan Penelitian Hibah Doktor. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional. Jakarta.
- NK, Dewi. 2009. Penjerapan Logam Berat Cd Menggunakan Enceng Gondok, IATPI. FT Universitas Diponegoro.
- NK, Dewi. 2010. Biomarker Metallothionein Pada Hati Ikan Sebagai Biomarker Pencemaran Logam Berat Kadmium (Cd) Di Perairan Kaligarang. Proseding Seminar Ikatan Ahli Teknik Penyehatan Lingkungan (IATPI). Program Studi Udayana. Denpasar
- NK, Dewi. 2011. Biomarker Pada Ikan Sebagai Biomonitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium di perairan Kaligarang Semarang. Seminar Nasional Penelitian Disertasi Doktor. Jakarta
- NK, Dewi. 2012. Metallothionein in The Fish Liver as Biomarker of Timbal (Pb) Heavy Metal Pollution in Kaligarang river, Semarang. Proseding Seminar Nasional Kimia Ke-3. Himpunan Kimia Industri Jawa Tengah.
- NK, Dewi. 2013. Metallothionein Pada Hati Ikan Sebagai biomarker Pencemaran Lingkungan Ligam Berat Kadmium (Cd) di Perairan Kaligarang. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*. Universitas Gadjah Mada
- Domouthsidou, G.P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers. Combination with trace metals concentrations. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 572–586.

GLOSARIUM

20

Detoksifikasi (bahasa Inggris: *detoxification, detox*) adalah lintasan metabolisme yang mengurangi kadar racun di dalam tubuh,^[1] dengan penyerapan, distribusi, biotransformasi dan ekskresi molekul toksin

15

Homeostasis merujuk pada ketahanan atau mekanisme pengaturan lingkungan kesetimbangan dinamis dalam (badan organisme) yang konstan. Homeostasis merupakan salah satu konsep yang paling penting dalam biologi. Bidang fisiologi dapat mengklasifikasikan mekanisme homeostasis pengaturan dalam organisme.

17

Inflamasi atau peradangan adalah upaya tubuh untuk perlindungan diri, tujuannya adalah untuk menghilangkan rangsangan berbahaya, termasuk sel-sel yang rusak, iritasi, atau patogen dan memulai proses penyembuhan

15

Kodon (kode genetik) adalah deret nukleotida pada mRNA yang terdiri atas kombinasi tiga nukleotida beruruta yang menyandi suatu asam amino tertentu sehingga sering disebut sebagai kodon triple

3

Metallothionein merupakan protein yang mengandung banyak asam amino sistein, memiliki berat molekul yang rendah serta memiliki kemampuan dalam mengikat dan mengkoordinasi atom-atom logam.

ISBN 978-602-1034-76-7



9 786021 034767

ORIGINALITY REPORT

13%

SIMILARITY INDEX

12%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

| | | |
|---|---|-----|
| 1 | openwetware.org Internet Source | 1% |
| 2 | ojs.unud.ac.id Internet Source | 1% |
| 3 | www.damandiri.or.id Internet Source | 1% |
| 4 | arifabiologi.blogspot.com Internet Source | 1% |
| 5 | etheses.uin-malang.ac.id Internet Source | 1% |
| 6 | labbiomol.blogspot.com Internet Source | 1% |
| 7 | repositori.uin-alauddin.ac.id Internet Source | 1% |
| 8 | Submitted to University of Newcastle upon Tyne Student Paper | <1% |
| 9 | Amiard, J.C.. "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification" | <1% |

and their use as biomarkers", Aquatic
Toxicology, 20060210

Publication

-
- | | | |
|----|---|-----|
| 10 | journal.unnes.ac.id Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 11 | grahailmu.co.id Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 12 | burhansetiabudi.wordpress.com Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 13 | Submitted to Universitas Islam Indonesia Student Paper | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 14 | Natalia A. Ossana. "Short communication: Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)", International Journal of Environment and Health, 2009 Publication | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 15 | id.unionpedia.org Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 16 | www.electrochemsci.org Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 17 | catatankuliahfarmasi.blogspot.com Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-
- | | | |
|----|---|-----|
| 18 | rachman-infoterapiwisata.blogspot.com Internet Source | <1% |
|----|---|-----|
-

| | | |
|----|---|-----|
| 19 | Submitted to Universitas Indonesia Student Paper | <1% |
| 20 | www.andisakab.com Internet Source | <1% |
| 21 | eprints.soton.ac.uk Internet Source | <1% |
| 22 | irrec.ifas.ufl.edu Internet Source | <1% |
| 23 | puspita-nero.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 24 | Submitted to University of Westminster Student Paper | <1% |
| 25 | repository.uinjkt.ac.id Internet Source | <1% |
| 26 | Submitted to UIN Sunan Gunung Djati Bandung Student Paper | <1% |
| 27 | imatelkisulsel.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 28 | www.scielo.cl Internet Source | <1% |
| 29 | lib.unnes.ac.id Internet Source | <1% |
| 30 | ucikastuti.wordpress.com Internet Source | <1% |

| | | |
|----|--|-----|
| 31 | Submitted to IAIN Batusangkar Student Paper | <1% |
| 32 | eltracytaocktora.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 33 | mitakd.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 34 | de.scribd.com Internet Source | <1% |
| 35 | digilib.its.ac.id Internet Source | <1% |
| 36 | abdulghofur91.files.wordpress.com Internet Source | <1% |
| 37 | drutama.wordpress.com Internet Source | <1% |
| 38 | Eva Hodel. "A microarray-based system for the simultaneous analysis of single nucleotide polymorphisms in human genes involved in the metabolism of anti-malarial drugs", Malaria Journal, 2009 Publication | <1% |
| 39 | Submitted to Lambung Mangkurat University Student Paper | <1% |
| 40 | saidisadi.blogspot.com Internet Source | <1% |

| | | |
|----|---|-----|
| 41 | jurnal.ugm.ac.id Internet Source | <1% |
| 42 | lightyagamiii.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 43 | Submitted to Universitas Brawijaya Student Paper | <1% |
| 44 | majour.maranatha.edu Internet Source | <1% |
| 45 | www.ghorabmed.net Internet Source | <1% |
| 46 | www.zonabiokita.web.id Internet Source | <1% |
| 47 | www.ices.dk Internet Source | <1% |
| 48 | muhammadwaliyuddin10.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 49 | www.worldscibooks.com Internet Source | <1% |
| 50 | airintan.wordpress.com Internet Source | <1% |
| 51 | mifa-s.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 52 | Submitted to Mississippi State University Student Paper | <1% |

53 wonderfullygift.blogspot.com <1 %
Internet Source

54 الشيخ ، تركي بن مبارك بن حمدان. "الدور الوقائي المحتمل لمادة الكارنيتين ضد التأثيرات السامة للمبيد الحشري (سيبرمثرين) في الفئران = The Possible Protective Role of Carnitine against the Toxic Effects of Cypermethrin Insecticide in Mice", King Abdulaziz University : Scientific Publishing Centre, 2012
Publication

55 zombiedoc.com <1 %
Internet Source

56 Submitted to Universitas Muhammadiyah Surakarta <1 %
Student Paper

57 elangbiru3004.blogspot.com <1 %
Internet Source

58 Hidalgo, Juan. "METALLOTHIONEIN AND BRAIN INFLAMMATION", Metallothioneins in Biochemistry and Pathology, 2008.
Publication

59 pergamos.lib.uoa.gr <1 %
Internet Source

60 adoc.tips <1 %
Internet Source

| | | |
|----|--|-----|
| 61 | Submitted to Universitas Airlangga Student Paper | <1% |
| 62 | NOVANDI R. "Remediasi Tanah Tercemar Logam Timbal (Pb) Menggunakan Tanaman Bayam Cabut (Amaranthus tricolor L.)", Jurnal Teknologi Lingkungan Lahan Basah, 2014 Publication | <1% |
| 63 | www.toxsci.oupjournals.org Internet Source | <1% |
| 64 | aviaintanrafiqa.blogspot.com Internet Source | <1% |
| 65 | Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper | <1% |
| 66 | Submitted to Universitas Muria Kudus Student Paper | <1% |
| 67 | Sun, Xiaofang, Xiaohua Niu, Ruochan Chen, Wenyin He, De Chen, Rui Kang, and Daolin Tang. "Metallothionein-1G Facilitates Sorafenib Resistance through Inhibition of Ferroptosis", Hepatology, 2016. Publication | <1% |

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

