

PENENTUAN KADAR 8-HIDROKSI-2'-DEOKSIGUANOSIN (8-OHdG) DALAM URIN TIKUS SETELAH TERPAPAR ETANOL DAN ASAP ROKOK

Mahardika Aprilia Iflahah, Ni Made Suaniti, dan Ida Ayu Raka Astiti Asih

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kadar 8-OHdG dalam urin tikus setelah terpapar etanol dan asap rokok selama 15 hari dengan KLT-Spektrofotodensitometer. Etanol dan asap rokok yang masuk dalam tubuh melalui berbagai metabolisme dapat meningkatkan jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga dapat mengakibatkan keadaan yang dinamakan stres oksidatif. Senyawa 8-OHdG merupakan hasil dari oksidasi DNA dalam tubuh yang berupa nukleotida guanin oleh ROS, 8-OHdG merupakan senyawa yang larut dalam air sehingga mudah diekskresikan melalui urin. Pada penelitian ini, pemaparan etanol dan asap rokok dosis tunggal dan kombinasi berpengaruh terhadap kadar 8-OHdG. Kadar 8-OHdG dalam urin tikus pada kelompok kontrol; perlakuan etanol; rokok; dan etanol-rokok berturut-turut adalah $(0,00 \pm 0,00)\%$, $(0,33 \pm 0,08)\%$, $(0,25 \pm 0,10)\%$, dan $(0,57 \pm 0,27)\%$.

Kata kunci: Etanol, Rokok, ROS, 8-OHdG, KLT-Spektrofotodensitomete

ABSTRACT

Urinary level of 8-OHdG in rats after exposure to ethanol and smoke have been investigated for 15 days with TLC-Spectrophotodensitometer. Ethanol and smoke exposure to could increase the number of Reactive Oxygen Species (ROS), which could lead to a state called oxidative stress. 8-OHdG compound is the result of DNA oxidation by ROS in the body in the form of guanine nucleotide. This 8-OHdG is a water-soluble compound excreted in urine easily. In this study, exposure of ethanol and smoke both singly and combined had an effect on the level of 8-OHdG. Urinary level of 8-OHdG in the control group; groups exposed to ethanol, smoke, and ethanol-smoke were $(0,00 \pm 0,00)\%$, $(0,33 \pm 0,08)\%$, $(0,25 \pm 0,10)\%$, and $(0,57 \pm 0,27)\%$ respectively.

Keywords: Ethanol, Smoke, ROS, 8-OHdG, TLC-Spectrophotodensitometer

PENDAHULUAN

Gaya hidup yang berpengaruh buruk terhadap kesehatan diantaranya adalah mengonsumsi alkohol dan merokok. Alkohol dan rokok sama-sama bersifat adiksi (ketagihan). Kombinasi dari 2 bahan adiktif ini dapat mempengaruhi sistem saraf (Dreisbach, 1971). Alkohol sebagai obat antikecemasan sedangkan nikotin sebagai antidepresan (Kurnia, 2009).

Metabolisme etanol di dalam sel hati menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dengan berbagai mekanisme (Chamulitrat, *et al.* 1998). Begitu juga pada tar dalam asap rokok

memiliki sedikitnya 4 jenis radikal bebas yang berbeda. Salah satu tipe radikal bebas yang menonjol adalah semiquinon yang melekat pada salah satu matrik polimer dan mengalami oksidasi reduksi penukaran dengan quinon dan hidroquinon (Oktavianis 2011).

Kenaikan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti radikal bebas menimbulkan kondisi yang dinamakan stres oksidatif (Wresdiyati, 2003). Stres oksidatif adalah kondisi yang terjadi ketika keseimbangan antara pro-oksidan dengan antioksidan bergeser ke arah reaktan (pro-oksidan), berpotensi menghasilkan kerusakan organik (Sivonova, *et al.*, 2004). Sasaran oksidasi oleh

ROS adalah makromolekul seperti lipid, karbohidrat, protein, dan DNA (*Deoxy Nucleic Acid*) (Sudjarwo, 2004).

Terjadinya stres oksidatif dalam tubuh dapat terdeteksi dari adanya senyawa-senyawa penanda stres oksidatif, salah satunya adalah 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHdG). 8-OHdG dalam tubuh dihasilkan dari oksidasi DNA yaitu nukleotida guanin oleh ROS. Hal ini menyebabkan keadaan yang disebut mutasi DNA (Sudjarwo, 2004). 8-OHdG merupakan senyawa yang mudah larut dalam air dan secara langsung diekskresikan melalui urin sebagai penanda kerusakan DNA yang paling terdeteksi dalam urin. Sehingga hal ini banyak digunakan sebagai penanda stres oksidatif (Boonla, *et al*, 2004).

Metode analisis dengan KLT-Spektrofotodensitometri merupakan metode yang jarang digunakan dalam analisis 8-OHdG. Metode ini lebih sederhana dibandingkan dengan metode menggunakan HPLC, GC, LC, maupun *immunoassay* (Ogino, 2007). Untuk itu, uji KLT memungkinkan untuk analisis kualitatif sekaligus kuantitatif dengan spektrofotodensitometer.

Berdasarkan latar belakang di atas, telah dilakukan penelitian untuk menentukan kadar 8-OHdG pada urin tikus setelah pemaparan etanol dan asap rokok baik dalam senyawa tunggal maupun kombinasi 2 senyawa yaitu etanol dan asap rokok, sehingga diharapkan dapat bermanfaat secara akademis dan aplikatif melalui analisis 8-OHdG sebagai penanda stres oksidatif karena pemaparan etanol dan asap rokok.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini terdiri dari metanol (p.a), ammonia (p.a), etil asetat (p.a), HCl (p.a), asetonitril (p.a), etanol (p.a), akuades, buffer pH 7, standar 8-OHdG, dansil klorida, rokok kretek merek X, dan hewan uji berupa tikus wistar jantan dengan berat badan 150-200 gram berumur 2-3 bulan.

Peralatan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pipet mikro, pipet tetes, sonde 1 mL, tabung urin, gelas ukur, pipet volume, bola

hisap, erlenmeyer, gelas beker, bejana elusi, botol vial kaca dan plastik, tabung reaksi, cawan penguap, corong gelas, alat sentrifugasi, *fisher vortex*, bejana SPE, AccuBond^{II} SPE ODS-C18 Cartridges 200mg 3mL, pompa vacum, HPTLC *precoated plates silica gel* MERC, *mini syringe* 100µL, penotol otomatis Camag Linomat IV, dan Spektrofotodensitometer (Camag TLC *Scanner* 3).

Cara Kerja

Perlakuan hewan uji

Hewan uji yang digunakan sebanyak 24 dan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (I), etanol (II), rokok (III), dan kombinasi antara etanol dan rokok (IV). Etanol diberikan sebanyak 1 mL melalui mulut menggunakan sonde, sedangkan asap rokok diberikan dengan menggunakan *aerator* agar asap tetap terjaga. Perlakuan diberikan selama 15 hari. Masing-masing kelompok diberikan nutrisi yang sama.

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel urin dilakukan pada hari ke-15 pemberian perlakuan. Sampel yang telah terkumpul disimpan di dalam lemari pendingin pada -20°C sebelum dianalisis sebagai langkah awal pengawetan sampel.

Ekstraksi fase padat

Sampel urin dikondisikan pada pH sekitar 7 dengan penambahan 2 M HCl. Tiap sampel disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit untuk menghilangkan endapan sebelum proses ekstraksi. Kolom dikondisikan dengan 3 mL metanol, 3 mL akuades, dan 3 mL buffer pH 7 (sebagai buffer A). Supernatan dari sampel urin diambil dan sebanyak 1 mL dimasukkan dalam kolom C18 tersebut. Kolom dicuci dengan 1,5 mL buffer A, 8-OHdG dielusi dengan 1,5 mL metanol 15% dalam buffer A. Eluat kemudian ditambahkan 3 mL asetonitril dan kemudian dihomogenisasi dengan vortex. Setelah itu, eluat diuapkan kemudian residu dilarutkan dengan 0,5 mL metanol untuk memberikan ekstrak pekat.

Analisis 8-OHdG dalam urin tikus dengan KLT-spektrofotodensitometer

Ekstrak urin ditambahkan 0,5 mL larutan penderivat dansil klorida, kemudian diinjeksikan pada plat KLT sebanyak 50 µL secara otomatis

kemudian dielusikan dengan fase gerak etil asetat : metanol : ammonia 17 : 2 : 1. Selama proses elusi bejana ditutup dengan rapat. Setelah proses elusi, plat KLT dikeringkan dan selanjutnya dilakukan proses *scanning* pada panjang gelombang 254 nm.

Hasil dari penginjeksian sampel diperoleh nilai Rf yang kemudian dibandingkan dengan larutan standar. Pendeteksian sampel dengan spektrofotodensitometer diperoleh nilai luas puncak, kemudian dihitung dengan perbandingan standar 1000 ppm.

Analisis data

Data kadar 8-OHdG yang didapatkan dari perhitungan selanjutnya dilakukan analisis statistik komparatif untuk menguji perbedaan data yaitu *One-way ANOVA* dalam *software* SPSS 13.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak pekat yang didapat dari hasil ekstraksi fase padat dilarutkan dengan metanol agar dapat ditotolkan pada plat KLT. Ekstrak 8-OHdG dalam metanol tersebut ditambahkan penderivat dansil klorida agar dapat berfluoresensi pada saat dilakukan analisis menggunakan spektrofotodensitometer. Dansil klorida dapat menganalisis senyawa-senyawa yang mengandung gugus amin primer dan sekunder.

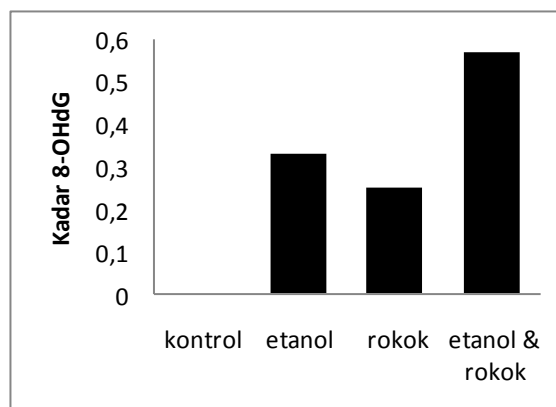
Hasil analisis 8-OHdG dalam urin sampel tikus secara kualitatif menunjukkan positif adanya 8-OHdG dalam sampel urin tikus kelompok II, III, dan IV. Parameter yang digunakan adalah perbandingan nilai Rf antara sampel dengan standar. Untuk Analisis kuantitatif ditunjukkan dengan data luas puncak dari hasil pengukuran pada bercak yang diukur langsung dengan cara densitometri. Kadar 8-OHdG dalam urin sampel dihitung dengan perbandingan antara luas puncak standar 1000 ppm dengan luas puncak urin sampel. Setelah itu, data dianalisis secara statistik sehingga didapatkan kadar 8-OHdG dalam urin. Data konsentrasi 8-OHdG dalam urin tikus ditunjukkan pada Tabel 1.

Nilai signifikan (*p*) yang didapat dari analisis *ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% adalah 0,00 dengan nilai standar signifikan 0,05 sehingga dapat dikatakan pemberian perlakuan pada hewan uji ini berpengaruh terhadap kadar 8-

OHDG. Pada uji *Post-hoc* LSD yang dilakukan untuk membandingkan beberapa perbandingan variabel, nilai signifikan dari perbandingan variabel kontrol terhadap etanol adalah 0,01, kontrol terhadap rokok 0,09, dan kontrol terhadap etanol rokok 0,00. Hal tersebut berarti pemberian perlakuan etanol dan rokok baik dalam dosis tunggal maupun kombinasi memberikan pengaruh terhadap konsentrasi 8-OHdG dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 1. Kadar 8-OHdG dalam urin tikus

Kelompok	Kadar 8-OHdG (%) (n=6)
I	0,00 ± 0,00
II	0,33 ± 0,08
III	0,25 ± 0,10
IV	0,57 ± 0,27



Gambar 1. Grafik kadar 8-OHdG dalam urin tikus kontrol, perlakuan etanol, rokok, dan etanol-rokok

Adanya 8-OHdG dalam urin hewan uji menunjukkan telah terjadinya oksidasi guanosis pada untai DNA oleh radikal bebas (Sudjarwo, 2004). Radikal bebas yang tergolong kuat adalah radikal oksigen spesies (ROS). ROS yang terdapat dalam tubuh hewan uji ini dapat berasal dari dalam tubuh hewan tersebut sendiri dan berasal dari luar tubuh atau lingkungan dapat disebabkan oleh polutan dan xenobiotik yang diperlakukan kepada hewan uji tersebut (Harliansyah, 2009). Mekanisme pembentukan 8-OHdG ditunjukkan pada Gambar 2.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemaparan etanol dan asap rokok pada tikus baik dalam dosis tunggal maupun kombinasi berpengaruh terhadap kadar 8-OHdG. Kadar 8-OHdG dalam urin tikus kelompok kontrol, perlakuan etanol, rokok, dan etanol-rokok berturut-turut adalah $(0,00 \pm 0,00)\%$, $(0,33 \pm 0,08)\%$, $(0,25 \pm 0,10)\%$, dan $(0,57 \pm 0,27)\%$. Kadar 8-OHdG dalam urin tikus yang terpapar etanol dan asap rokok menunjukkan tingkat stres oksidatif. Urutan kadar 8-OHdG sebagai penanda stres oksidatif dari yang paling rendah hingga yang paling tinggi adalah kelompok perlakuan rokok, etanol, dan etanol-rokok.

Saran

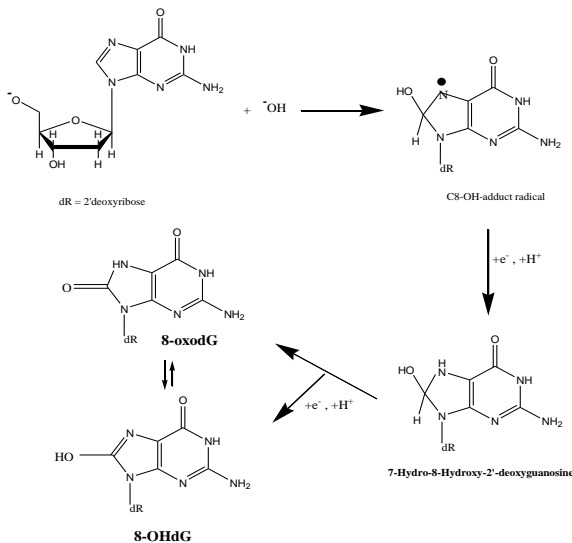
Perlu dilakukan penelitian mengenai analisis 8-OHdG karena pemaparan xenobiotik lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para penguji Prof. Dr. Drs. I Wayan Budiarsa Suyasa, M.Si., I Nengah Simpen, S.Si., M.Si., dan Ni Luh Rustini, S.Si., M.Si. serta kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boonla, Chanchai., Wunsuwan, Rattiporn., Tungsanga, Kriang., and Tosukhowong, Piyaratana, 2007, Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is Elevated in Patients with Nephrolithiasis, *Springer-Verlag*, 10.1007/s00240-007-00980
- Chamulitrat, Walee., Carnal, Jean., Reed, Nicole M., Spitzer, and John J., 1998, Radical generation In vivo endotoxin enhances biliary ethanol-dependent free, *Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 0193-1857, 274 : G653-G661



Gambar 2. Mekanisme oksidasi 2'-deoksiganosin menjadi 8-OHdG oleh ROS (Valavanidis, *et al.*, 2009)

Jumlah 8-OHdG dalam urin menunjukkan jumlah hilangnya guanosis pada untai DNA hewan uji. Jumlah hilangnya guanosis pada untai DNA sebanding dengan banyaknya ROS yang dibutuhkan untuk mengoksidasi guanosis. Ini berarti, makin tinggi jumlah ROS, makin tinggi pula jumlah guanin yang teroksidasi menjadi 8-OHdG.

Untuk perlakuan pemaparan dosis kombinasi etanol dan rokok menunjukkan nilai kadar 8-OHdG dalam urin yang paling tinggi daripada perlakuan etanol dan perlakuan rokok karena jumlah radikal dalam kelompok hewan uji tersebut paling tinggi yang disebabkan oleh xenobiotik yang masuk ke dalam tubuh kelompok hewan uji tersebut lebih banyak. Pada perlakuan terhadap kelompok etanol, kadar 8-OHdG yang dihasilkan lebih tinggi daripada perlakuan asap rokok. Ini berarti jumlah radikal dalam hewan uji tersebut lebih besar daripada jumlah radikal dalam hewan uji kelompok perlakuan asap rokok. Besarnya jumlah radikal bebas sebanding dengan tingkat stres oksidatif, sehingga makin tinggi kadar 8-OHdG dalam urin sampel makin tinggi pula tingkat stres oksidatif.

- Dreisbach, RH., 1971, *Handbook of Poisoning: Diagnosis Treatment*, 7th., Large Medical Publication, California
- Harliansyah, 2009, Penuaan dan Beberapa Aspek Yang Menyertainya, *Farmacia*, 9 (3)
- Kurnia, Hendrawan, 2009, *Kiat Jitu Tangkal Penyakit Orang Kantoran*, Best Publisher, Yogyakarta
- Ogino, K. and Wang, D., 2007, Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention, *Acta Med. Okayama*, 61 (4) : 181-189
- Oktavianis, 2011, Efek Pemberian Asap Rokok terhadap Kehamilan Tikus (*Rattus norvegicus*), *Tesis*, Universitas Andalas, Padang
- Sivonova, M., Zitnanova, I., Hlincikova, L., Skodacek, I., Trebaticka, J., & Durackova, Z., 2004, Oxidative stress in university students during examinations, *Comenius University*, 7 (3) : 183-188
- Sudjarwo, 2004, 8-hidroksi-deoksiganosin sebagai Salah Satu Indikator Infertilitas Pria, *Ber. Penel. Hayati*, 10 : 43-47
- Wresdiyati, T., 2003, Aktivitas Anti Inflamasi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) pada Ginjal Tikus yang Mengalami Perlakuan Stres, *Jurnal.Teknol. dan Industri Pangan*, 113, XIV (2) : 113-120
- Valavanadis, Athanasios., Vlachogianni, Thomais., and Fiotakis, Constantinos., 2009, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis, *Journal of Environmental Science and Health*, 27 : 120-139