

## Hubungan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Superoxide Dismutase* (SOD) dengan Protein $\alpha$ -Sinuklein-larut Air pada Batang Otak Tikus yang Diinduksi Rotenon

Arief Budi Yulianti,<sup>1</sup> Sony Heru Sumarsono,<sup>2</sup> Ahmad Ridwan,<sup>2</sup>  
Ayda T. Yusuf<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biologi Medik dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung

<sup>2</sup> Kelompok Riset Fisiologi, Biologi Perkembangan dan Ilmu Biomedika, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

### Abstrak

Parkinson adalah salah satu penyakit neurodegeneratif dengan gangguan gerak bila kematian neuron dopaminergik lebih dari 70%. Paparan neurotoksin diduga menjadi penyebab parkinson sporadik. Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi stres oksidatif pada batang otak tikus *Wistar* yang diinduksi rotenon. Metode penelitian eksperimental dengan menggunakan tikus *Wistar* jantan. Penelitian dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) periode Januari 2011–November 2013. Variabel bebas yaitu kelompok tikus, lama perlakuan, waktu pengamatan, dan lokasi di batang otak. Variabel terikat yaitu konsentrasi *superoxide dismutase* (SOD), konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air, dan densitas *reactive oxygen species* (ROS). Densitas ROS berbeda secara signifikan antara kelompok perlakuan ( $p=0,029$ ), waktu pengamatan ( $p=0,0001$ ), dan lokasi di batang otak ( $p=0,001$ ). Konsentrasi SOD tidak berbeda secara signifikan antarkelompok perlakuan ( $p=0,566$ ), waktu pengamatan ( $p=0,441$ ), dan lokasi di batang otak ( $p=0,091$ ). Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air berbeda secara signifikan antarkelompok perlakuan ( $p=0,001$ ) dan waktu pengamatan ( $p=0,001$ ), tetapi tidak berbeda secara signifikan pada lokasi di batang otak ( $p=0,625$ ). Densitas ROS relatif tertinggi pada hari ke-10 dan ke-40. Sementara itu, konsentrasi SOD pada hari ke-10 dan ke-40 relatif rendah, sedangkan konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air pada hari ke-10 relatif tinggi dibanding dengan hari ke-40. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa stres oksidatif pada batang otak tikus *Wistar* yang diinduksi rotenon berpengaruh pada struktur perubahan protein  $\alpha$ -sinuklein.

**Kata kunci:** Batang otak, protein  $\alpha$ -sinuklein, ROS, rotenon, SOD, stres oksidatif

## The Relationship among Reactive Oxygen Species (ROS), Superoxide Dismutase (SOD), and $\alpha$ -Synuclein Protein-Water Soluble in Wistar Rat's Brainstem Treated with Rotenone

### Abstract

Parkinson is the neurodegenerative disease with movement disordered, if the dopaminergic neurons dead more than 70%. Neurotoxins exposure is predicted cause sporadic parkinson. The research aim was to determine oxidative stress stage in the brainstems Wistar rat's treated-rotenone. An experimental study using male Wistar rats. The study was held in School of Life Sciences and Technology during January 2011–November 2013. The independent variables: groups of rats, long treatment, observation time, and location in the brainstem. The dependent variables: superoxide dismutase (SOD) concentration, concentration of protein  $\alpha$ -synuclein-water soluble, and reactive oxygen species (ROS) density. Reactive oxygen species (ROS) density significantly different among treatment groups ( $p=0.029$ ), observation time ( $p=0.0001$ ), and the location in the brainstem ( $p=0.001$ ). Superoxide dismutase (SOD) concentrations were not significantly different among treatment groups ( $p=0.566$ ), observation time ( $p=0.441$ ) and the location in the brainstem ( $p=0.091$ ). The concentration of protein  $\alpha$ -synuclein-water soluble was significantly different among treatment groups ( $p=0.001$ ) and observation time ( $p=0.001$ ), but not significantly different at the location in the brainstem ( $p=0.625$ ). Reactive oxygen species (ROS) density were relatively high at day 10 and 40. Meanwhile SOD concentration on day 10 and 40 were relatively low. The concentration of  $\alpha$ -synuclein protein-water soluble on day 10 was relatively higher than on day 40. The conclusion is oxidative stress in the brainstem Wistar rat's treated-rotenone effected on the protein  $\alpha$ -synuclein structure changes.

**Key words:**  $\alpha$ -synuclein protein, brainstem, oxidative stress, ROS, rotenone, SOD



## Pendahuluan

Parkinson merupakan salah satu penyakit neurodegeneratif yang mengenai orang berusia di atas 65 tahun. Penyakit ini menyebabkan penderita mengalami gangguan gerak yang akan muncul pada saat kematian neuron dopaminergik lebih dari 70%.<sup>1</sup> Penyebab penyakit tersebut sampai saat ini belum jelas, tetapi secara etiologi dapat dibedakan menjadi parkinson familial yang antara lain disebabkan oleh mutasi pada gen *SNCA* dan parkinson sporadik yang diduga disebabkan oleh kondisi stres oksidatif pada neuron yang berlangsung lama.<sup>2,3</sup>

Stres oksidatif merupakan kondisi yang menggambarkan terdapat ketidakseimbangan radikal bebas dengan antioksidan seluler. Hal ini disebabkan radikal bebas diproduksi berlebih atau antioksidan selular tidak bekerja dengan baik.<sup>4</sup> Kondisi ini akan mengakibatkan biomolekul sel, seperti protein, lipid, dan asam nukleat teroksidasi.<sup>5</sup>

Radikal bebas yang terdapat di dalam sel berasal dari produksi samping metabolisme, terutama oksigen yang disebut *reactive oxygen species* (ROS), terdiri atas radikal bebas anion superoksida ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radikal bebas anion hidroksi ( $\bullet\text{OH}$ ), dan juga peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).<sup>6,7</sup> *Reactive oxygen species* (ROS) dapat mengakibatkan biomolekul seperti protein, lipid, dan asam nukleat teroksidasi. Hal ini akan menyebabkan perubahan struktur biomolekul sehingga akan memengaruhi metabolisme neuron. Secara fisiologis normal peningkatan ROS di dalam neuron akan ditekan oleh antioksidan seluler dan salah satunya adalah *superoxide dismutase* (SOD).

*Superoxide dismutase* (SOD) adalah suatu antioksidan seluler dari golongan enzim yang mengkatalisis radikal bebas anion superoksida ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan air ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Enzim ini banyak ditemukan di otak karena konsumsi oksigen otak sangat tinggi.<sup>8,9</sup> Terdapat tiga macam SOD yang dibedakan berdasarkan atas ko-faktornya, yaitu (1)  $\text{SOD}_1$  merupakan SOD sitosolik dengan ko-faktor seng (Zn) dan tembaga (Cu); (2)  $\text{SOD}_2$  merupakan SOD mitokondria dengan ko-faktor mangan (Mn); (3)  $\text{SOD}_3$  merupakan SOD ekstraselular dengan ko-faktor Zn dan Cu.<sup>10,11</sup> Pada kondisi neuron mengalami stres oksidatif menyebabkan protein  $\alpha$ -sinuklein teroksidasi. Hal ini terjadi diduga berhubungan dengan struktur protein  $\alpha$ -sinuklein.<sup>12</sup>

Protein  $\alpha$ -sinuklein adalah protein otak yang sampai saat ini belum jelas fungsinya, tetapi selalu terkait dengan penyakit neurodegenerasi, misalnya alzheimer, *multiple system atrophy* (MSA), dan parkinson.<sup>13</sup>  $\alpha$ -Sinuklein merupakan *monomeric natively unfolded protein* yang cenderung membentuk  $\alpha$ -heliks. Struktur ini menyebabkan protein  $\alpha$ -sinuklein cenderung larut air.

Penelitian ini adalah bagian dari penelitian patogenesis parkinson sporadik pada tikus *Wistar* yang diinduksi dengan rotenon. Rotenon merupakan pestisida alami yang menyebabkan kompleks I mitokondria terhambat. Keadaan ini mengakibatkan radikal bebas anion superoksida pada neuron meningkat sehingga akan terjadi stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif yang berlangsung lama diperkirakan akan memicu neurodegenerasi yang dimulai di batang otak.<sup>14</sup>

Penelitian ini difokuskan pada kondisi stres oksidatif di batang otak tikus *Wistar* dengan parameter, yaitu (1) densitas ROS yang diukur secara langsung; (2) konsentrasi SOD; dan (3) konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air. Apakah pemberian rotenon dengan paparan akut dan kronik akan dapat meningkatkan stres oksidatif pada batang otak tikus *Wistar* sehingga terjadi penurunan konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air?

Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi stres oksidatif pada batang otak tikus *Wistar* yang diinduksi rotenon.

## Metode

Hewan percobaan tikus *Wistar* jantan sejumlah 72 ekor berumur 8–9 minggu dengan bobot badan 200–250 g berasal dari rumah hewan, SITH ITB. Pengembangbiakan, pemeliharaan, pemberian perlakuan, dan pengorbanan sudah sesuai dengan ketentuan Komite Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung.

Senyawa kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotenon (R8875), *sunflower seed oil* (S5007), *SOD assay kit* WST SOD (19160) dibeli dari Sigma, *rat  $\alpha$ -synuclein* ELISA kit (MBS722815) yang dibeli dari MyBiosource, senyawa kimia lain yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Merck.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan empat variabel bebas, yaitu (1) kelompok tikus adalah kelompok blanko tanpa perlakuan; kelompok pelarut-rotenon, diberikan *sunflower*



*seed oil* dengan dosis 1 mL/kg bobot badan/hari, diberikan intraperitoneal;<sup>15,16</sup> kelompok rotenon, diinduksi dengan rotenon dosis 2,5 mg/kg bobot badan/hari intraperitoneal;<sup>15,17-20</sup> (2). lama perlakuan terdiri atas 9, 19, dan 28 hari; (3). waktu pengamatan terdiri atas paparan akut (hari ke-10, -20, -30) dan paparan kronik (hari ke-40, -50, -60); (4). lokasi pada batang otak terdiri dari batang otak atas dan batang otak bawah. Variabel yang diamati adalah (1). pengamatan biokimia: konsentrasi SOD dan konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air serta (2). pengamatan secara biofisika adalah pemeriksaan ROS secara langsung.

Tikus jantan sebanyak 36 ekor dikorbankan dengan melakukan dekapitasi karena bobotnya lebih dari 200 g.<sup>21,22</sup> Batang otak diisolasi dan dipisahkan antara batang otak atas dan batang otak bawah, kemudian disimpan dalam nitrogen cair. Sampel ini digunakan untuk mengukur superoksida dismutase (SOD) dan protein  $\alpha$ -sinuklein larut air.

Semua sampel batang otak atas dan batang otak bawah untuk pemeriksaan biokimia di-*thawing* pada suhu 4°C, kemudian dicuci tiga kali dengan PBS yang mengandung 0,16% heparin dan dihancurkan dengan menggunakan *homogenizer*. Setelah itu, diberi bufer fosfat 0,1 M, pH 7 sampai volumenya 2 mL.<sup>23</sup> Homogenat itu disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh di-*aliquot*, kemudian disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -80°C. Sampel ini digunakan dalam pemeriksaan SOD dan protein  $\alpha$ -sinuklein larut air.

Pembuatan homogenat untuk pemeriksaan radikal bebas dilakukan secara bertahap sesuai dengan waktu pengamatan. Pada hari ke-10, 6 (enam) ekor tikus dikorbankan dengan cara dekapitasi, kemudian batang otaknya diisolasi, dipisahkan batang otak atas dan batang otak bawah, segera dimasukkan ke dalam Eppendorf 1,5 mL. Setelah itu, dicuci dengan menggunakan PBS yang mengandung heparin 0,16 mg/mL sebanyak tiga kali dan dihancurkan menggunakan *homogenizer*. Segera ditambahkan 0,5 mL bufer fosfat 0,1 M, pH 7 dan dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Selanjutnya, sampel dikeringkan selama 24 jam dengan menggunakan *freeze dry* yang dikerjakan di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia FMIPA ITB.<sup>24</sup> Sampel yang sudah kering disimpan dalam es kering dan dibawa ke Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan

Radiasi BATAN Jakarta. Pemeriksaan densitas ROS dilakukan setiap 10 hari selama 60 hari. Penelitian dilaksanakan dalam periode Januari 2011–November 2013.

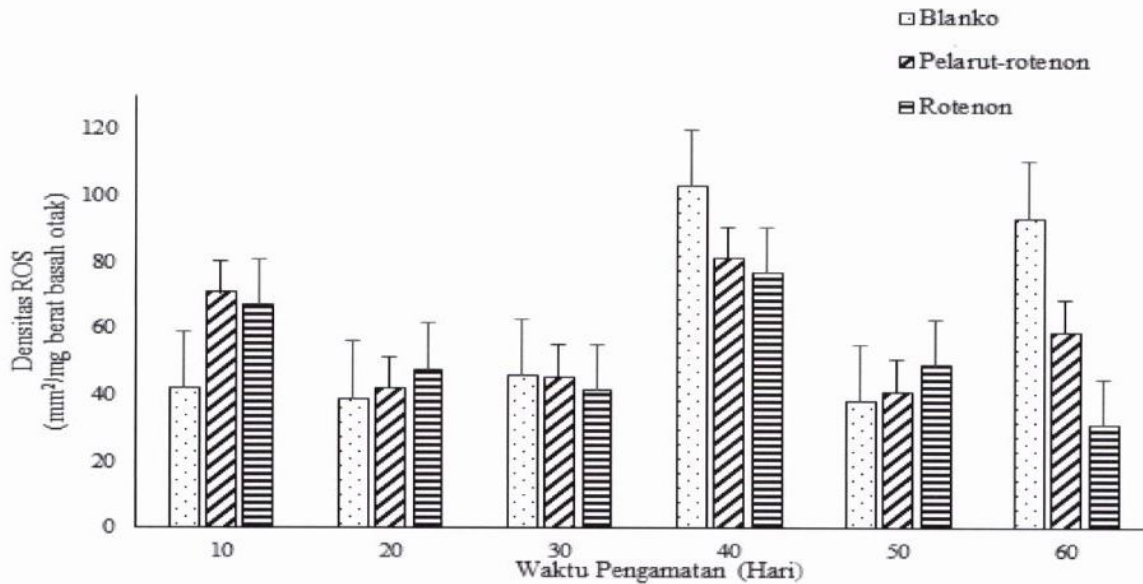
Pengolahan data penelitian ini dan analisis statistik menggunakan IBM SPSS versi 21. Data penelitian berdistribusi normal dan homogen. Variabel bebas adalah (1). kelompok perlakuan: kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon; (2). lamanya perlakuan 9, 19, dan 28 hari; (3) waktu pengamatan paparan akut (hari ke-10, -20, -30) dan paparan kronik (hari ke-40, -50, dan -60); serta (4) lokasi pada batang otak tikus *Wistar*: batang otak atas dan batang otak bawah. Variabel terukur, yaitu (1). pemeriksaan biokimia: SOD dan protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air; (2) pemeriksaan biofisika: ROS. Data ini disajikan dalam rata-rata $\pm$ SEM (*standard error of mean*). Hubungan antara variabel bebas dan variabel terukur dilakukan menggunakan analisis univariat dengan taraf kebermaknaan 5%, dilakukan untuk masing-masing variabel terukur.

## Hasil

Densitas ROS pada batang otak tikus *Wistar* yang diperiksa secara langsung memberikan gambaran sebagai berikut: (1) batang otak atas: di batang otak atas rata-rata densitas ROS pada kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon secara berurutan adalah 60,23 $\pm$ 17,12; 56,48 $\pm$ 9,71; dan 52,25 $\pm$ 13,80 mm<sup>2</sup>/mg berat basah otak (Gambar 1). Pada paparan akut memperlihatkan densitas ROS tertinggi pada hari ke-10 terjadi pada kelompok pelarut-rotenon dan kelompok rotenon, sedangkan pada kelompok blanko terjadi pada hari ke-30. Pada paparan kronik densitas ROS tertinggi pada hari ke-40 terjadi pada semua kelompok; (2) batang otak bawah: di batang otak bawah densitas ROS rata-rata pada kelompok blanko, pelarut-rotenon, dan rotenon secara berurutan adalah 50,73 $\pm$ 7,9; 47,06 $\pm$ 10,30; dan 35,61 $\pm$ 6,19 mm<sup>2</sup>/mg berat basah otak (Gambar 2). Pada paparan akut densitas ROS tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40 terjadi pada semua kelompok.

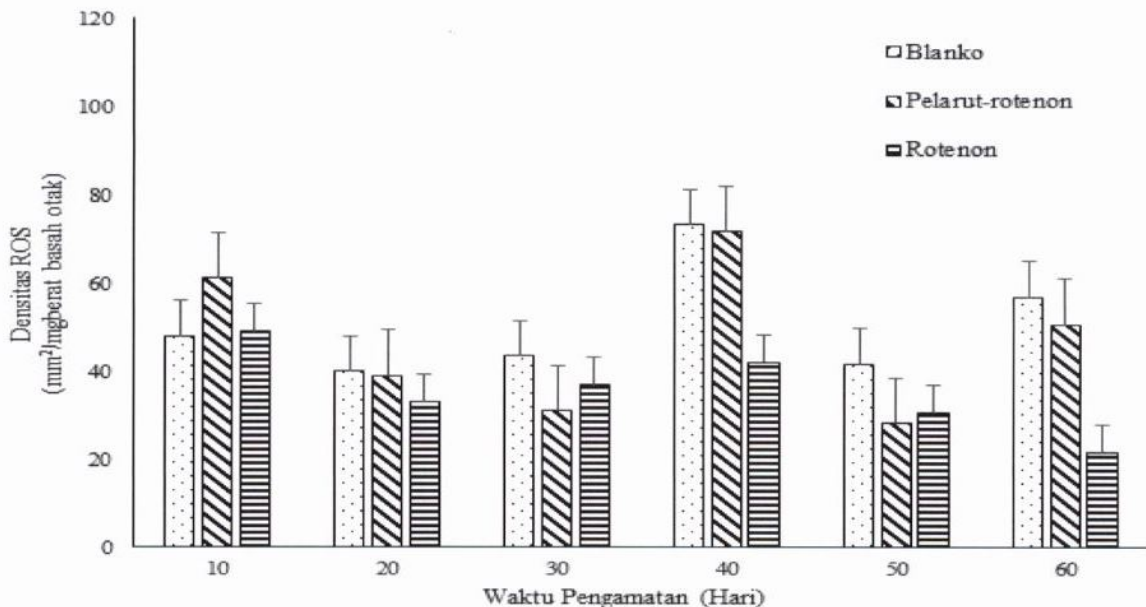
Berdasarkan uji statistik diperoleh hasil bahwa idensitas ROS berbeda secara signifikan antara kelompok perlakuan ( $p=0,029$ ), begitu juga antara waktu pengamatan ( $p=0,0001$ ) dan lokasi di batang otak ( $p=0,001$ ). Uji Tukey: (1). kelompok: densitas ROS pada kelompok rotenon





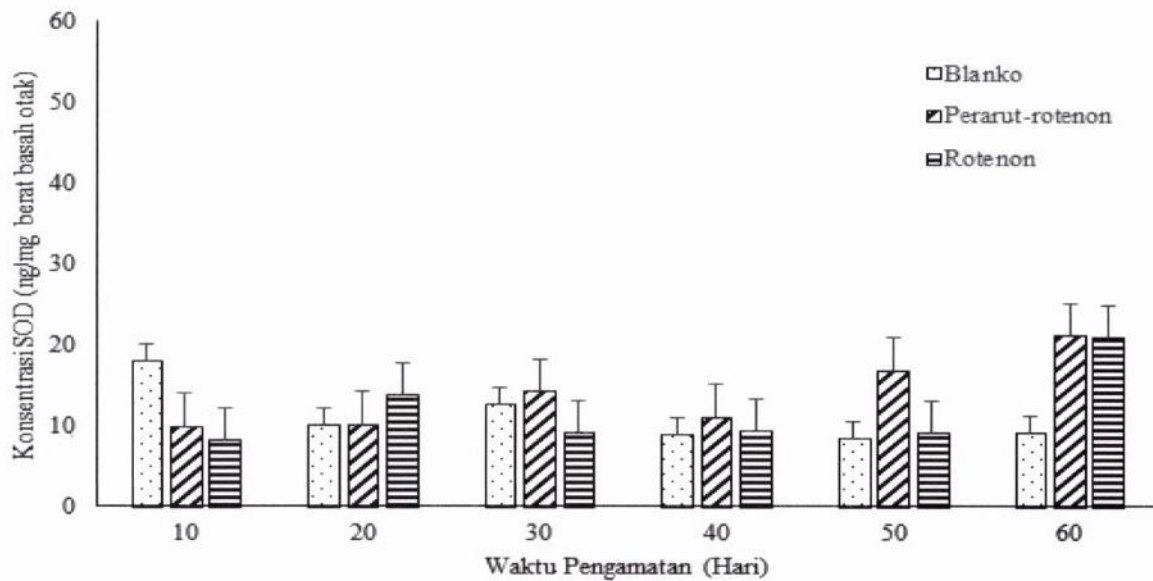
**Gambar 1** Densitas ROS pada Batang Otak Atas Tikus *Wistar*

Densitas ROS di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-30, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Densitas ROS di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Densitas ROS di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40.



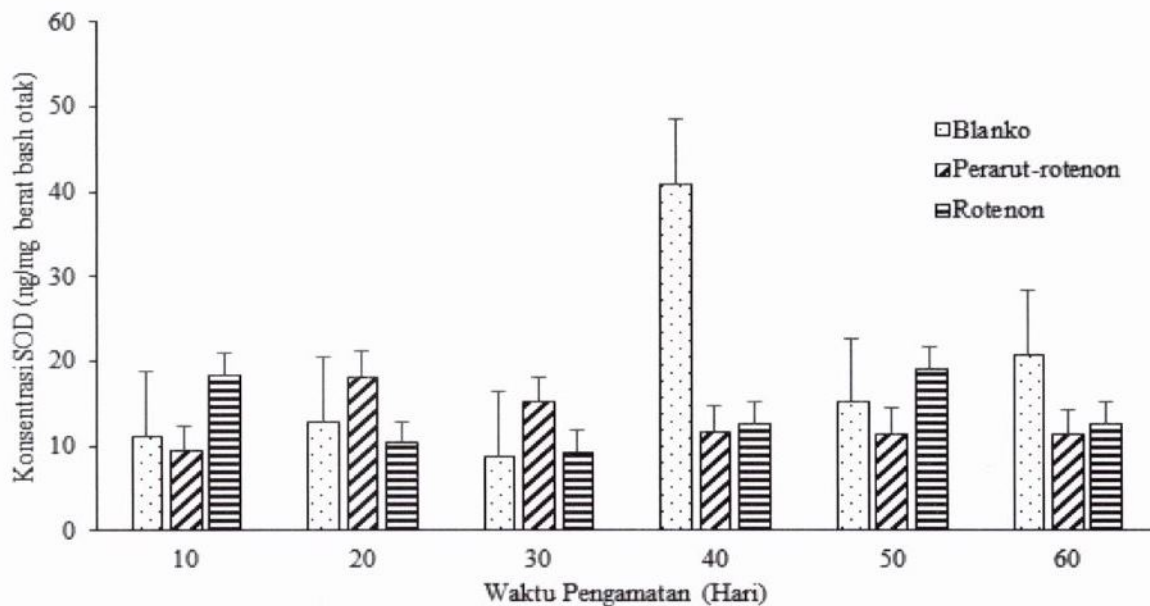
**Gambar 2** Densitas ROS pada Batang Otak Bawah Tikus *Wistar*

Densitas ROS di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Densitas ROS di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Densitas ROS di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40.



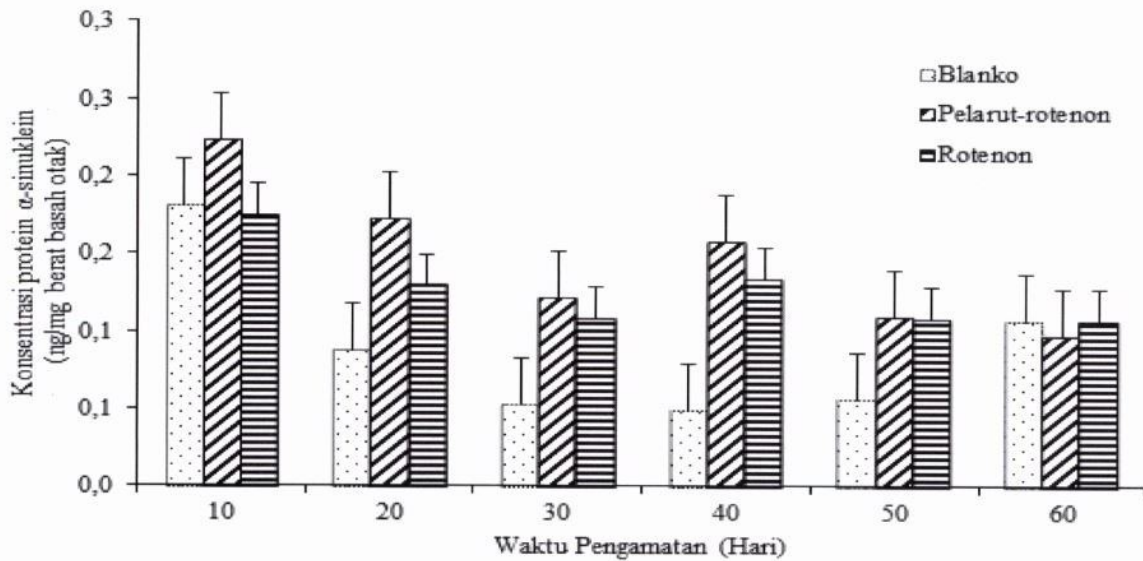
**Gambar 3** Konsentrasi SOD pada Batang Otak atas Tikus *Wistar*

Konsentrasi SOD di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi SOD di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-30, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi SOD di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60.



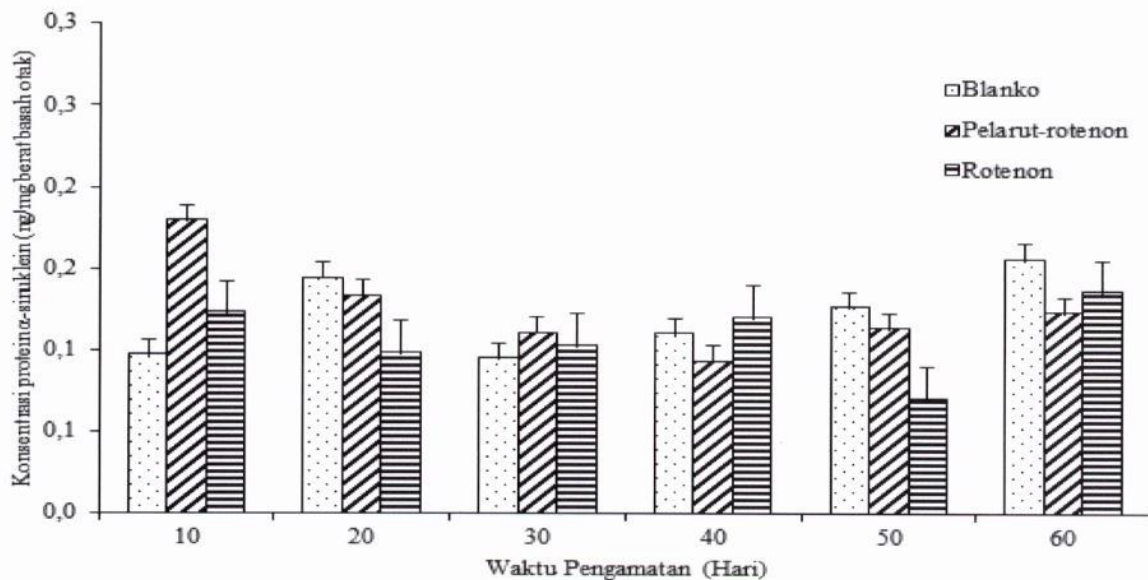
**Gambar 4** Konsentrasi SOD pada Batang Otak Bawah Tikus *Wistar*

Konsentrasi SOD di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Konsentrasi SOD di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Konsentrasi SOD di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-50.



**Gambar 5** Konsentrasi Protein  $\alpha$ -Sinuklein Larut Air pada Batang Otak Atas Tikus *Wistar*

Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40.



**Gambar 6** Konsentrasi Protein  $\alpha$ -Sinuklein Larut Air pada Batang Otak Bawah Tikus *Wistar*

Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di kelompok blanko (titik-titik) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di kelompok pelarut-rotenon (garis miring) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein di kelompok rotenon (garis melintang) pada paparan akut tertinggi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60.



berbeda signifikan dengan kelompok blanko, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok pelarut-rotenon dan (2). waktu pengamatan: densitas ROS pada hari ke-10 berbeda secara signifikan dengan densitas ROS pada hari ke-40. Sementara itu, densitas ROS pada batang otak atas relatif lebih tinggi bila dibanding dengan densitas ROS pada batang otak bawah.

Konsentrasi SOD di batang otak tikus *Wistar* memperlihatkan gambaran sebagai berikut: (1) batang otak atas: konsentrasi SOD rata-rata di kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon secara berurutan adalah  $11,23 \pm 2,05$ ;  $13,93 \pm 4,06$ ; dan  $11,83 \pm 3,92$  ng/mg berat basah otak (Gambar 3). Paparan yang akut pada kelompok blanko memperlihatkan konsentrasi SOD tertinggi terjadi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Sementara itu, pada kelompok pelarut-rotenon konsentrasi SOD yang tertinggi pada paparan akut terjadi pada hari ke-30, sedangkan paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Pada paparan akut di kelompok rotenon konsentrasi SOD tertinggi terjadi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60; (2) batang otak bawah: konsentrasi SOD rata-rata pada kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon secara berurutan adalah  $18,27 \pm 7,63$ ;  $12,94 \pm 2,88$ ; dan  $13,74 \pm 4,51$  ng/mg berat basah otak (Gambar 4).

Konsentrasi SOD di kelompok blanko pada paparan akut terjadi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Hal yang sama terjadi pada kelompok pelarut-rotenon. Sementara itu, pada kelompok rotenon pada paparan akut konsentrasi SOD tertinggi terjadi pada hari ke-10, sedangkan paparan yang kronik terjadi pada hari ke-60. Konsentrasi SOD di batang otak atas pada kelompok blanko cenderung menurun yang sejalan dengan waktu pengamatan, sedangkan di batang otak bawah terjadi sebaliknya. Konsentrasi SOD di batang otak atas yang terjadi pada kelompok pelarut-rotenon cenderung meningkat, sedangkan di batang otak atas terjadi sebaliknya. Konsentrasi SOD di batang otak atas pada kelompok rotenon cenderung meningkat sejalan dengan waktu pengamatan, sedangkan di batang otak bawah berlaku sebaliknya. Dari uraian di atas terlihat perbedaan antarkelompok perlakuan, walaupun demikian konsentrasi SOD antarkelompok tidak berbeda secara signifikan ( $p=0,566$ ). Begitu juga antarwaktu pengamatan ( $p=0,441$ ) dan lokasi di

batang otak ( $p=0,091$ ).

Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di batang otak tikus *Wistar* sebagai berikut: (1) batang otak atas: konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein rata-rata larut air di kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon secara berurutan adalah  $0,09 \pm 0,03$ ;  $0,15 \pm 0,02$ ; dan  $0,13 \pm 0,02$  ng/mg berat basah otak (Gambar 5). Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air tertinggi di kelompok blanko pada paparan akut terjadi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Sementara itu, pada kelompok pelarut-rotenon konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein pada paparan akut terjadi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-40. Hal yang sama terjadi pada kelompok rotenon; (2) batang otak bawah: konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air pada kelompok blanko, kelompok pelarut-rotenon, dan kelompok rotenon secara berurutan adalah  $0,12 \pm 0,02$ ;  $0,12 \pm 0,02$ ; dan  $0,11 \pm 0,02$  ng/mg berat basah otak (Gambar 6).

Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air tertinggi di kelompok blanko pada paparan akut terjadi pada hari ke-20, sedangkan pada paparan kronik terjadi pada hari ke-60. Sementara itu, pada kelompok pelarut-rotenon konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein pada paparan akut terjadi pada hari ke-10, sedangkan pada paparan yang kronik terjadi pada hari ke-60. Hal yang sama terjadi pada kelompok rotenon. Konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air antarkelompok perlakuan berbeda secara signifikan ( $p=0,001$ ), begitu pula antarwaktu pengamatan ( $p=0,001$ ), tetapi tidak berbeda secara signifikan pada lokasi di batang otak ( $p=0,625$ ). Uji Tukey: (1) kelompok blanko berbeda secara signifikan dibanding dengan kelompok pelarut-rotenon; (2) waktu pengamatan hari ke-10 berbeda secara signifikan dengan waktu pengamatan lainnya.

## Pembahasan

Fenomena parkinson sporadik diduga terjadi karena paparan neurotoksin di lingkungan. Salah satu neurotoksin yang diduga menyebabkan parkinson sporadik adalah rotenon oleh karena dapat menghambat kompleks I mitokondria melalui jalur stres oksidatif. Rotenon adalah pesitisisida hayati yang berasal dari akar tanaman *Derris elliptica* dan *Derris mallaccensis* dari famili *leguminosae*. Pada tikus *Wistar* jantan yang diinduksi rotenon diduga akan terjadi penghambatan kompleks I mitokondria pada



neuron tikus *Wistar* tersebut.<sup>15,17,20</sup> Keadaan ini mengakibatkan radikal bebas anion superoksida ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) meningkat yang merupakan bagian dari ROS. Pada penelitian ini diperoleh di kelompok rotenon densitas ROS meningkat pada hari ke-10 dan hari ke-40, terjadi baik di batang otak atas atau pun batang otak bawah (Gambar 1 dan Gambar 2).

Peningkatan ROS ini berhubungan dengan paparan akut rotenon, sedangkan pada paparan kronik terjadi penurunan densitas ROS, diduga masih terjadi proses penyembuhan kembali batang otak karena tikus jantan yang digunakan adalah tikus muda.<sup>25</sup>

Konsentrasi SOD di batang otak atas pada hari ke-10 relatif lebih rendah, begitu juga pada hari ke-40. Sementara itu, konsentrasi SOD di batang otak bawah pada hari ke-10 relatif lebih tinggi dibanding dengan hari ke-20 dan ke-30, sedangkan pada hari ke-40 relatif sama dengan hari ke-60 (Gambar 3 dan 4).

Dengan demikian, konsentrasi SOD dengan densitas *reactive oxygen species* (ROS) yang diukur secara langsung bertolak belakang pada saat densitas ROS meningkat, maka konsentrasi SOD menurun dan juga berlaku sebaliknya. Sementara itu, densitas ROS relatif rata-rata lebih tinggi di batang otak atas dibandingkan dengan densitas ROS di batang otak bawah. Sebaliknya, konsentrasi SOD lebih rendah di batang otak atas dibanding dengan di batang otak bawah. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa aktivitas neuron lebih tinggi di batang otak atas. Hal ini berhubungan dengan letak otak tengah yang terletak di batang otak atas, artinya aktivitas neuron di otak tengah meningkat dengan paparan rotenon. Dengan demikian, patut diduga bahwa paparan akut rotenon menyebabkan neuron mengalami stres oksidatif, sedangkan paparan kronik cenderung berfluktuatif.

Kondisi stres oksidatif yang berlangsung lama pada neuron diduga akan menyebabkan perubahan struktur protein  $\alpha$ -sinuklein dari larut air menjadi tidak larut air dan terakumulasi menjadi oligomer dan protofibril yang bersifat toksik.<sup>26-29</sup> Pada penelitian konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein-larut air di batang otak atas pada hari ke-10 relatif tinggi dibanding dengan konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein pada hari ke-40.<sup>3</sup> Sementara itu, di batang otak bawah terjadi sebaliknya, yaitu konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein relatif lebih rendah pada hari ke-

10 dibanding dengan hari ke-40. Penurunan konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein larut air di batang otak atas menguatkan dugaan bahwa di batang otak atas sudah terjadi stres oksidatif, sementara di batang otak bawah belum terjadi stres oksidatif atau dapat dikatakan neuron di batang otak bawah masih beradaptasi baik terhadap paparan rotenon tersebut. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa stres oksidatif dimulai dari neuron di otak tengah.<sup>14</sup> Untuk mengetahui mekanisme stres oksidatif perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, terutama hal yang berhubungan dengan protein  $\alpha$ -sinuklein yang menjadikan suatu marker untuk penyakit neurodegeneratif, khususnya untuk parkinson sporadik.

## Simpulan

Densitas *reactive oxygen species* (ROS) yang diukur secara langsung relatif lebih tinggi di batang otak atas dibanding dengan densitas ROS di batang otak bawah. Konsentrasi *superoxide dismutase* (SOD) berlaku sebaliknya, relatif lebih rendah di batang otak atas dibanding dengan di batang otak bawah. Hal yang sama terjadi pada konsentrasi protein  $\alpha$ -sinuklein. Dengan demikian, patut diduga stres oksidatif sudah terjadi dari paparan akut dan berawal di batang otak atas, khususnya otak tengah.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dilakukan dengan bantuan dana dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung. Penulis haturkan terima kasih kepada Dekan beserta jajaran yang sudah berkenan memberi bantuan, baik dana dan keluangan waktu yang diberikan pada penulis.

## Daftar Pustaka

1. Huaser DN, Hasting TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 2013;51:35-42.
2. Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann New York Acad Sci.* 2008;1147:93-104.
3. Yulianti AB, Sumarsono SH, Ridwan A, Yusuf AT. Increase of oxidative stress and accumulation of  $\alpha$ -synuclein in *Wistar* rat's



- midbrain treated with rotenone. *ITB J Sci.* 2012;44A(4):317–32.
4. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Med Cell Longevity.* 2012:1–12.
  5. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Investig.* 2003;111:163–9.
  6. Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applied during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem.* 2011;286:18056–65.
  7. Selivaňov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, dkk. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Computat Biol.* 2011;7(3):1–17.
  8. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Neuroscience.* 2004;S18–25.
  9. Pejić SV, Todorović SA, Pajović S. Cu/Zn-superoxide dismutase in brain of rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2006:116–22.
  10. Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, dkk. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2008;283(23):16169–77.
  11. Levin ED, Patel M, Christopher NC, Liang L, Lateef S, Crapo JD, dkk. Extracellular superoxide dismutase overexpression protects against aging-induced cognitive impairment in mice. *Behavior Genetics.* 2012;32(2):119–25.
  12. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammod CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *J Biol Chem.* 2009;90(3):191–214.
  13. Bendor JT, Ogan TP, Edwards RH. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron.* 2013;79:1044–67.
  14. Braak H, Del-Tredici K, Rubo U, De-Vos RAI, Steur ENHJ, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24:197–211.
  15. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behavioral Brain Research.* 2002;136:317–24.
  16. Xiong N, Huang J, Zhang Z, Zhang Z, Xiong J, Liu X, dkk. Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for parkinson's disease. *PLoS ONE.* 2009;4:1–11.
  17. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, dkk. Mechanism of toxicity in rotenone models of parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003;23(34):10756–64.
  18. Hoglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, dkk. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* 2003;84:491–502.
  19. Samantaray S, Knaryan VH, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. The parkinsonian neurotoxin rotenone activities calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience.* 2007;146(2):741–55.
  20. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1301–6.
  21. Carbone LG. Death by decapitation: a case study of the scientific definition of animal welfare. *Society Animals.* 1997;5(3):239–56.
  22. Reilly JS. Euthanasia of animal used for scientific purposes. Australia and New Zealand Council for the Care of Animal in Research and Teaching. Department of Environmental Biology. Australia: Adelaide University; 2001.
  23. Marttilla RJ, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in parkinson's disease: increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci.* 1998;86:321–31.
  24. Adam G. The principles of freeze-drying. Dalam: Day JG, Stacey GN, penyunting. *Methods in molecular biology: cryopreservation and freeze-drying protocols.* Edisi ke-2. New Jersey: Humana Press Inc; 2007. hlm. 15–35.
  25. Otitoju O, Onwurah NE, Otitoju GTO, Ugwa CEU. Oxidative stress and superoxide dismutase activity in brain of rats fed with diet containing permethrin. *Biochemistry.* 2008;20(2):93–8.
  26. Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin



- D, Skaper SD, Giusti P.  $\alpha$ -Synuclein and parkinson disease. *Federation of European Biochemical Societies J.* 2004;18:617–26.
27. Bandopadhyay R, Belleruche J. Pathogenesis of parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. *Trends Mol Med.* 2009;16(1):27–36.
28. Unal-Cevik I, Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M, Lule S, Gurer G, Can A, dkk. Alpha-synuclein aggregation induced by brief ischemia negatively impacts neuronal survival in vivo: a study in [A30P] alpha-synuclein transgenic mouse. *J Cerebral Blood Flow Metab.* 2011;31:913–23.
29. Marques O, Outeiro TF. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis.* 2012;3:1–7.