

# EKSPRESI LEVEL GEN MRNA PROTEIN EKSTRASELULER OTAK EMBRIO MENCIT BLACK-6 UK-12 AKIBAT INDUKSI 2-METHOXYETHANOL: ANALISIS SECARA REAL TIME RT-PCR

Yulia Iridayanti<sup>1</sup>, Win Darmanto<sup>2</sup>, dan Agus Abadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biologi FMIPA, Universitas Negeri Jakarta  
e-mail: [iridayanti@yahoo.com](mailto:iridayanti@yahoo.com)

<sup>2</sup>Biologi FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya  
e-mail: [darmanto@unair.ac.id](mailto:darmanto@unair.ac.id)

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

## ABSTRACT

The aim of this research was to investigate impact of 2-methoxyethanol, a major industrial chemical, and its individual metabolites on the expression DNA of the embryonic brain development of black-6 mice. The expression levels mRNA protein of GAPDH, Fibronectin, tenascin, vimentin, Neurofilamen, NCAM between brain embryo treatment with 2-ME at gestation day 12 and Embryo control were achieved. The Electroforesis DNA on brain Embryonic day 12 showed that there were expression of GAPDH (447bp), Fibronectin (462bp), NCAM (293 bp), Tenascin (416bp), Vimentin (327), Neurofilamen high (301bp), Neurofilamen medium (289bp), Neurofilamen low (398bp). This Data not showed. The expression of level of mRNA for protein Vimentin at embryonic brain treatment at GD-12 is 487 copies, meanwhile on the embryonic brain control is 209 copies. This expression is tendency very higher than control. Another level of mRNA for protein fibronectin, NCAM, Tenascin, Neurofilament were tendency not differ between embryonic brain treatments and control. Intermediate filaments, vimentin, is found in specific cell types in the developing and adult central nervous systems (CNS), particularly astrocytes. Recently, found that vimentin immunoreactivities were increased in astrocytes and/or macrophages in the spinal cords of rats with autoimmune inflammation). So that The higher level mRNA for protein vimentin caused by effect 2-methoxyethanol. Vimentin contribute to the repair of brain through the migration of activated cells and increased level vimentin at embryonic brain treatment with 2-ME.

**Key words:** vimentin, GAPDH, Fibronectin, tenascin, Neurofilamen, Ncam, 2-methoxyethanol, Otak

## PENGANTAR

2-Methoxyethanol (2-ME) adalah salah satu contoh senyawa *glycol ether* yang merupakan turunan dari senyawa *phthalate ester*. Senyawa ini banyak digunakan sebagai bahan dasar plastik dan bahan pelarut industri cat. Limbah senyawa ini sering terbuang di lingkungan dan menjadi bahan polutan, khususnya di lingkungan perairan atau sungai (Miller *et al.*, 1983). 2-ME telah diketahui bersifat toksik dan teratogenik pada beberapa spesies mamalia (Feuston *et al.*, 1990). Telah dilaporkan bahwa beberapa orang telah keracunan 2-ME melalui penetrasi ke dalam kulit dan saluran pernapasan (Dugard *et al.*, 1984). Sekitar 100.000 orang teracuni 2-ME per tahun, dari jumlah tersebut diduga adalah kaum wanita yang masih dalam masa subur atau mampu melahirkan (Scoot *et al.*, 1989). Senyawa 2-ME juga diketahui sangat potensial menyebabkan kelainan perkembangan otak terdedah (Darmanto *et al.*, 1998). Hal ini disebabkan oleh hasil metabolisme 2-ME di dalam sel liver menjadi *methoxyacetic acid* (MAA), dengan bantuan katalisator *alcohol dehydrogenase* (Brown *et al.*, 1984; Moslen *et al.*, 1995). Mengingat begitu luasnya penggunaan

2-ME di dalam kehidupan manusia, maka risiko terjadinya cacat janin akibat terpaparnya senyawa 2-ME, juga semakin besar.

Otak adalah organ yang penting karena merupakan organ yang memiliki fungsi koordinasi. Kegagalan perkembangan otak akan mengakibatkan gangguan hampir semua fungsi tubuh karena masa pembentukan organ otak, adalah paling awal, namun selesai pembentukannya paling akhir. Proses pembentukan otak melibatkan berbagai proses, yaitu *proliferasi sel, migrasi, interksi sel, adhesi sel, diferensiasi dan morfogenesis*. Mekanisme interaksi sel sangat berperan dalam proses migrasi, diferensiasi, dan morfogenesis, dalam membentuk suatu jaringan atau organ. Di samping itu, mekanisme adesi juga sangat berperan dalam pembentukan arsitektur suatu jaringan atau organ. Mekanisme tersebut, tidak hanya melibatkan interaksi sel dengan sel, tetapi juga interaksi sel dengan matriks protein seluler.

Matriks protein seluler dapat dibedakan menjadi matriks protein ekstraseluler dan matriks protein intraseluler. Matriks protein ekstraseluler, dibangun oleh berbagai macam substansi protein dan sel-sel ekstraseluler. Matriks

protein ekstraseluler, biasanya mengisi ruang-ruang antarsel. Substansi protein ekstraseluler disekresikan oleh sel yang terdapat di dalam matriks ekstraseluler, yang dapat membentuk kerangka jaringan yang saling berhubungan erat dengan permukaan sel yang menghasilkannya. Substansi protein ekstraseluler pada vertebrata, berperan sebagai substrat bagi sel-sel untuk bermigrasi, memberikan signal dalam perkembangan dan memberikan arah pergerakan dari sel, pengatur tingkah laku sel-sel yang saling berhubungan antara satu dengan yang lainnya, mempengaruhi kemampuan hidup sel, sebagai tempat bagi hormon-hormon dalam mengontrol dan diferensiasi sel (Bruce *et al.*, 2002). Gangguan yang terjadi pada protein ekstraseluler, dapat menyebabkan gangguan mekanisme interaksi sel, yang pada akhirnya dapat mengganggu proses perkembangan. Sementara sel-sel ekstraseluler, yang tertanam dalam substansi protein ekstraseluler tersebut, berperan tidak hanya mengikat sel-sel bersama-sama, tetapi juga memengaruhi kemampuan hidup, bentuk polaritas dan tingkah laku dari sel.

Pada sistem syaraf pusat, substansi protein ekstraseluler tersusun oleh protein-protein yang disekresi oleh sel-sel ekstraseluler yaitu sel *radial glial* dan *astroglial*, yang tertanam dalam substansi protein ekstraseluler. Protein-protein disekresi ke dalam sitoplasma atau keluar dari sel atau terikat pada membran sel. Otak merupakan bagian dari sistem saraf pusat. Otak pada masa embrio, dapat mengekspresikan berbagai macam protein ekstraseluler. Pola ekspresinya tergantung pada jaringan yang sedang berdiferensiasi dan bersifat sementara. Seperti yang telah dikatakan di atas bahwa dalam proses perkembangan otak, melibatkan proliferasi dan migrasi sel. Proses proliferasi sel-sel epitel terjadi di *ventrikular zone*, membentuk sel bergranular dan sel *glial*. Sel granuler akan membentuk sel *Purkinje* dan berinteraksi dengan sel *glial*, yang akan memandunya untuk bermigrasi ke *intermediate zone*, sehingga membentuk lapisan sel *Purkinje*. Bila terjadi gangguan pada sintesis protein ekstraseluler oleh sel-sel *glial*, maka proses migrasi juga akan terhambat. Hambatan yang terjadi pada proses proliferasi sudah banyak diketahui dan dapat menyebabkan kelainan perkembangan, begitu juga hambatan terhadap proses migrasi sel, khususnya migrasi sel *Purkinje*, telah terbukti menyebabkan kelainan pola foliasi pada tikus (Darmanto *et al.*, 1998; Darmanto *et al.*, 2000). Pada penelitian yang telah dilakukan, terbukti bahwa 2-ME mengganggu pola foliasi. Diduga bahwa penyimpangan pola foliasi berkaitan erat dengan gangguan migrasi sel *Purkinje*, seperti pada kelainan pola foliasi akibat radiasi sinar X. Kelainan migrasi sel *Purkinje*

tersebut juga telah ditunjukkan secara jelas sebagai akibat menurunnya ekspresi protein ekstraseluler, yaitu protein *Reelin* (Darmanto *et al.*, 2000). *Reelin* adalah suatu jenis protein ekstraseluler, yang disekresi oleh sel *Cajal-Retzius* yang berlokasi di zona *marginal* dari korteks *cerebral* otak (Dutta *et al.*, 2005). Protein tersebut diduga berfungsi sebagai pengatur posisi sel dan migrasi sel saraf pada otak (Götz *et al.*, 1996). Penelitian juga membuktikan bahwa 2-ME menyebabkan kelainan pada otak fetus mencit yang induknya diberi 2-ME, kelainan yang muncul berupa eksensefali, penipisan korteks serebrum, kelainan pola foliasi pada cerebellum (Prihiyantoro *et al.*, 2004). Diduga kematian sel ini merupakan penyebab terjadinya kegagalan penutupan *neural tube* karena terjadi ketidakseimbangan antara proliferasi sel dan kematian sel (Hildebrand dan Dorigana, 1999). Penyebab lainnya adalah kegagalan *recovery* akibat induksi zat yang bersifat toksik ini menyebabkan gangguan ekspresi protein yang diperlukan untuk penutupan *neural tube*. Gangguan ekspresi protein telah dibuktikan oleh (Prihiyantoro *et al.*, 2004), bahwa terdapat penurunan kadar protein total pada sampel otak kelompok perlakuan dengan menggunakan 2-ME dosis 12,5 pada umur kebuntingan 11 hari dibandingkan sampel otak kelompok control.

Dari penelitian yang telah kami lakukan, pada embrio uk-10 hari, ditemukan adanya protein ekstraseluler selain protein *Reelin* yang berperan dalam perkembangan otak, yaitu *fibronektin*, *tenaskin*, *vimentin*, *neurofilamen* dan *neural cell adhesion molecule* (Irnidayanti, 2009). *Vimentin* merupakan protein yang sangat penting karena protein ini biasa dipakai sebagai *marker* terhadap diferensiasi sel-sel *glial* (Steinert dan Roop, 1988; Tardy *et al.*, 1989; Oudega and Marani, 1991). *Vimentin*, berperan dalam proses neurogenesis karena ekspresinya bersamaan dengan protein *neurofilamen* pada sel neuroblas (Houle dan Fedoroff, 1983; Cochard and Paulin, 1984; Lee and Page, 1984; Oudega and Marani, 1991). *Fibronektin* merupakan dimer glikoprotein yang paling banyak peranannya sebagai molekul adesif, melekatkan sel dengan substrat; untuk migrasi sel; dan untuk interaksi molekul dalam sel dengan matriks ekstraseluler. *Fibronektin* merupakan matrik ekstraseluler penting pada saat embriogenesis. Kekurangan komponen ini dalam neurulasi dapat menyebabkan *neural tube* tidak terbentuk secara sempurna.

Oleh karena itu, kami menduga bahwa protein *Reelin* bukanlah protein ekstraseluler satu-satunya, yang dapat mengganggu proses perkembangan organ otak, tetapi kami menduga masih banyak protein ekstraseluler lainnya yang turut berperan dalam proses tersebut. Berdasarkan

hasil penelitian di atas tersebut, maka penelitian yang akan kami lakukan bertujuan untuk mengetahui perubahan level ekspresi mRNA protein ekstraseluler pada otak embrio mencit umur kebuntingan 12 hari (uk-12 hari), apabila induknya diberi 2-methoxy-ethanol pada uk-10 hari. Apakah terdapat pengaruh terhadap perubahan level ekspresi mRNA (cDNA) hasil PCR melalui analisis secara *real time RT-PCR*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Hewan Percobaan

Mencit Black-6 mice yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Charite-Universitat Medizin, Berlin. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Charite-Universitat Medizin, Berlin, Jerman. Pemeliharaan hewan dilakukan pada temperatur ruang 23–27° C dan kelembaban 83%. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Pada saat kematangan seksual (10–12 minggu), dikawinkan dengan jantan (1:1). Adanya *vagina plug* ditandai sebagai hari kehamilan ke nol (Rugh, 1968).

### Bahan, Dosis dan Pengumpulan Sampel

MAA (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH) dalam bentuk cair yang diperoleh dari Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan (nomor produk: 135–07762) dilarutkan dalam air steril, diberikan secara injeksi peritoneal dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan ke-10 hari. Mencit kontrol hanya diberi akuades steril dengan dosis yang sama. Mencit bunting uk-12 hari, dibunuh secara dislokasi serviks, otak diisolasi dan dimasukkan dalam larutan RNA

latter, kemudian disimpan untuk analisis lanjut pada suhu -20° C.

### Real Time RT-PCR

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan *RNAeasy Kit* (Cat No. 74106). Otak dihomogenasi dengan larutan buffer RLT dalam tabung yang berisi butiran keramik selama 30 detik. Debris seluler dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 11000 rpm selama 1 menit pada temperatur ruang. Total RNA dari jaringan otak diekstraksi dengan *RNeasy kit* berdasarkan *manufactur's protocols*. Total RNA dianalisis dengan fotometer. cDNA disintesis dari total RNA menggunakan *Qiagen One step RT-PCR Kit* (Cat. No. 210210). Reaksi PCR menggunakan enzim *Aid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLVRT* (Cat. No. 130125486) pada suhu 95° C, 7 min, PCR 45 siklus (20 det, 95° C; 60° C, 20 det; 72° C, 30 det), 42° C, selama 1 jam 15 menit, dan diikuti dengan pemanjangan suhu 70° C selama 5 menit, 70° C, 5 menit. Sampel cDNA disimpan dalam *refrigerator* (-20° C) untuk analisis *Real time RT-PCR*.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan *Real-Time PCR* menggunakan *SYBR Green PCR kit* (Cat No. 204143), berdasarkan *manufactur's protocols*. Analisis dilakukan dengan menambah *Primer* ke cDNA otak. Pada eksperimen kami, *Primer-Mix* terdiri atas 8 jenis primer yaitu, *GADPH*, *FNI(mix1)*, *Ncam1*, *Tnc*, *Vim*, *Nefh*, *Nefm*, *Nefl*. *Primer* yang digunakan dalam penelitian ini *disintesis ke Biotex Berlin-Buch GmbH*, Berlin, Jerman. Informasi *primer-primer*, dapat dilihat pada Tabel 1. Pada *Master mix* cDNA sampel otak anggota baik kontrol maupun perlakuan, ditambahkan akuades, *SYBER Green*, *2x Bioline buffer*. Selanjutnya

**Tabel 1.** Sekuensing posisi primer (f = forward; r = reverse), % kandungan G/C dan referensi produk primer

Primer	Sequence (5'----->3')	GC (%)	TIB reference no.
GAPDH f	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA	56,5	017079:553U23
GAPDH r	GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG	60,9	17079:977L23
Fibronectin-f	AGG CAT AAG GTT CGG GAA GAG GT	52,2	005403 69362F23
Fibronectin -r	GCA GTT GTC ACA GCG CCA GCC	66,7	005403 77639R21
NCAM-f	GGT GCA GTT TGA TGA GCC AGA GG	56,5	001081445:1891F23
NCAM-r	CGT CCT CTC CCA TCT GCC CTT C	63,6	001081445:2162R22
Tenascin-f	CTA CAG CCT GGC AGA CCT GAG	61,9	011607.2:5397F21
Tenascin-r	CTT GTA GGT CCA CCC GGA GCT	61,9	011607.2:5792R21
Vimentin-f	CTG AGG CTG CCA ACC GGA ACA A	59,1	011701.3:1376F22
Vimentin-r	CCT CGC CTT CCA GCA GCT TCC	66,7	011701.3:1682R21
Nf h-f	AGG AGA TAA CTG AGT ACC GGC G	54,5	010904.3:1071F22
Nf h-r	CCA AAG CCA ATC CGA CAC TCT TC	52,2	010904.3:1349R23
Nf m-f	GTG GTT CAA ATG CCG CTA CGC C	59,1	008691.2:1055F22
Nf m-r	GAG GCC CGG TGA TGC TTC CTG	66,7	008691.2:1432R21
Nf l-f	TGG CCT TGG ACA TCG AGA TTG CA	52,2	010910:1221F23
Nf l-r	GCT TCT CCT TCA GAG GGG GGC	66,7	010910:1489R21

reaksi *Real Time RT-PCR* menampilkan berbagai seri cDNA target yang diikuti oleh *Oligonucleotide primers*. Ekspresi mRNA dievaluasi dengan kurva amplifikasi *Light Cycler real-time RT-PCR*. Fase eksponensial PCR, dapat terdeteksi ketika signal *fluorescence* dari hasil PCR yang terakumulasi, lebih besar dari latar *fluorescence*. *Light Cycler software versi 3.5* digunakan untuk mengkalibrasi (Rasmussen, 2001). Data dianalisis secara deskriptif (Steel dan Torrie, 1981; Taylor, 1985).

## HASIL

Hasil level mRNA secara *real time RT-PCR* dari otak mencit black-6 menggunakan *primer GAPDH, Fibronectin, NCAM, Tenaskin, Vimentin, Neurofilamen high, medium and low*, tertera pada Gambar 1. Jumlah level mRNA *Fibronectin* otak embrio perlakuan pada uk-12, tereksresi sekitar 191 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, yaitu 409. Sementara level mRNA otak embrio kontrol uk-10 hari berkisar pada 36. Bila diamati level ekspresi mRNA pada otak embrio kontrol uk-10 dan 12 hari, tampak bahwa adanya peningkatan yang tajam, tetapi kemudian cenderung menurun setelah diberi perlakuan dengan *2-meyhoxxyethanol*, yaitu 191 (Tabel 2 dan Tabel 3).

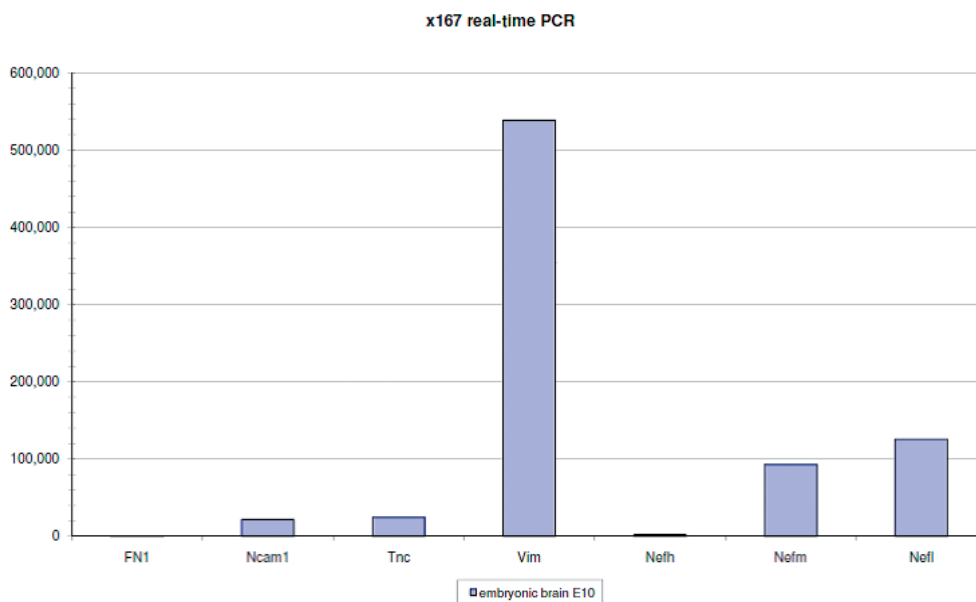
Sementara jumlah level ekspresi mRNA *Ncam* pada otak embrio perlakuan pada uk-12 hari, adalah 56,494 hari lebih tinggi dari control, yaitu 41,013. Ekspresi level mRNA otak embrio kontrol uk-10 hari adalah 21,708, dan

cenderung mengalami peningkatan, baik pada otak embrio kontrol uk-12 hari maupun pada perlakuan uk-12 hari. Tampaknya level ekspresi mRNA fibronectin dan *Ncam* pada otak embrio uk-10 dan uk-12 hari, cenderung semakin meningkat, tetapi setelah pemberian 2-ME, level ekspresi mRNA *Fibronectin* cenderung menurun, berbeda dengan *Ncam*, yang cenderung meningkat (Tabel 2 dan Tabel 3).

Level ekspresi mRNA *Tenaskin* otak embrio perlakuan uk-10 hari tampak cenderung menurun dari 24.505 menjadi 7.954, lalu terjadi peningkatan setelah pemberian 2-ME, yaitu 31.091.

Level ekspresi mRNA *vimentin* otak embrio perlakuan uk-12 hari tereksresi cenderung sangat tinggi dibandingkan dengan otak embrio kontrol uk-12 hari. Jumlah level mRNA, tersebut sekitar 487,259 dan 209,650. Jika dibandingkan dengan level mRNA otak embrio kontrol uk-10 hari, yaitu 538, menunjukkan kecenderungan menurun pada otak embrio kontrol uk-12 hari dan cenderung meningkat kembali setelah pemberian 2-ME (tabel 2 dan tabel 3). Ekspresi mRNA *Vimentin* cenderung sangat tinggi, dibandingkan dengan level mRNA protein-protein lainnya, baik pada otak embrio kontrol uk-10 dan otak embrio kontrol uk-12 hari, maupun pada otak embrio yang diberi senyawa 2-ME (Gambar 1 dan Gambar 2).

Level ekspresi mRNA ketiga sub unit neurofilamen (*Nef*) bervariasi. Variasi ekspresi ketiga subunit neurofilamen berhubungan dengan fungsi dari sel-sel selama stadium



**Gambar 1.** Jumlah level mRNA *Fibronectin* (FN 1), *Ncam* 1, *Tenaskin* (Tnc), *Vimentin* (Vim), *Neurofilamen* (Nefh), *Neurofilamen* (Nefm), *Neurofilamen* (Nefl) pada otak embrio umur kebuntingan 10 dari induk uk-10 hari, secara *Real Time RT-PCR* (□ : otak embrio kontrol uk-10).

perkembangan. Jumlah level ekspresi mRNA Nefh pada otak embrio perlakuan uk-12 hari, sangat rendah sekali di antara ketiga sub-unit neurofilamen. Begitu pula yang terjadi pada otak embrio kontrol uk-12 hari. Level ekspresi mRNA, Nefh pada otak embrio perlakuan uk-12 hari, yaitu 3070 cenderung lebih tinggi dari kontrol, yaitu 1169. Pada otak embrio kontrol uk-10 hari berkisar 2419, kemudian cenderung mengalami penurunan pada embrio kontrol uk-12 hari dan cenderung meningkat kembali setelah pemberian 2-ME (Tabel 2 dan Tabel 3).

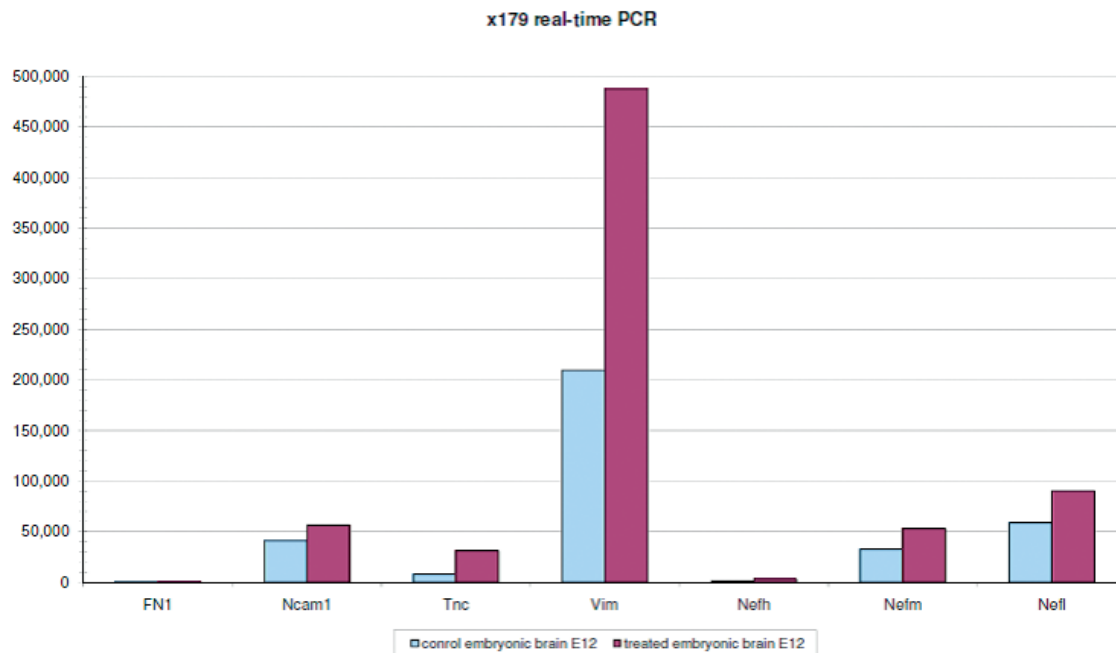
Jumlah level ekspresi neurofilamen medium otak

embrio kontrol uk-10 hari adalah 92.928 (Tabel 3), kemudian cenderung menurun drastis menjadi 32.758 pada otak embrio kontrol uk-12 hari. Setelah pemberian 2-ME cenderung mengalami peningkatan kembali menjadi 53.173, pada uk-12 hari (Tabel 2). Sementara level ekspresi mRNA neurofilamen *low* pada otak embrio kontrol uk-10 hari adalah 125.809, yang juga cenderung mengalami penurunan pada otak embrio kontrol uk-12 hari mencapai 58.378. Pemberian 2-ME, menyebabkan peningkatan ekspresi level mRNA Nefl menjadi 90.155 pada otak embrio uk-12 (Tabel 3).

Dalam Penelitian ini level ekspresi mRNA GAPDH

**Tabel 2.** Kondisi siklus level mRNA otak embrio UK-10 hari, secara real-time reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR).

No.	Name	Ct	Take Off	Amplification	Tm [°C]	Tm [°C]	Calc. Conc. (copies/reaction)	(copies/1 Mio GAPDH)
GAPDH - brain								
A1	E10	8.73	6.4	1.59	87.4		19,485,318	
A2	FN1	32.36	29.7	1.87	76.3	85.4	705	36
A3	Ncam1	17.58	15.4	1.76	87.4		422,996	21,708
A4	Tnc	17.30	15.1	2.00	85.1		477,488	24,505
A5	Vim	10.16	8.0	1.60	86.3		10,493,895	538,554
A6	Nefh	22.65	19.8	1.69	87.1		47,143	2,419
A7	Nefm	14.22	11.8	1.75	89.6		1,810,728	92,928
A8	Nefl	13.52	11.1	1.72	86.9		2,451,429	125,809



**Gambar 2.** Jumlah level mRNA Fibronektin (FN 1), Ncam 1, Tenaskin (Tnc), Vimentin (Vim), Neurofilamen (Nefh), Neurofilamen (Nefm), Neurofilamen (Nefl) pada otak embrio uk-12 hari dari induk yang diberi 2-ME pada uk-10 hari dan otak embrio kontrol uk 12 hari dari induk yang tidak diberi 2-ME, hasil real time RT-PCR. (□ : otak embrio kontrol uk-12 hari; ■ : otak embrio perlakuan uk12 hari)



pada otak embrio kontrol uk-10 hari dan uk-12 hari (Tabel 2 dan 3) adalah 19.485.318 dan 2.388.594. GAPDH biasanya digunakan sebagai kontrol endogen. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, merupakan enzim glikolisis. Terlepas dari peranannya sebagai enzim yang terlibat dalam glikolisis, enzim ini juga terekspresikan pada peristiwa yang tidak berhubungan dengan fungsi glikolisis. Oleh karena itu, digunakan sebagai kontrol.

## PEMBAHASAN

Perkembangan Otak melibatkan berbagai peristiwa yang mencakup proliferasi sel epitel dan migrasi prekursor neuron-neuron ke tempat semestinya pada tabung neural (Jacobson, 1991, dalam Götz *et al.*, 1996). Interaksi neuron dan glial sel berperan penting dalam proses migrasi tersebut. Dalam hal ini protein-protein matriks ekstraseluler yang memperantarai proses migrasi dan proliferasi. Hasil amplifikasi *Real Time RT-PCR* dari jaringan otak embrio mencit black-6 menunjukkan adanya perubahan level ekspresi mRNA protein ekstraseluler *Fibronektin*, *Tenaskin*, *Ncam*, *Vimentin* dan *neurofilamen*. Perubahan tersebut dibandingkan dengan adanya kontrol endogen dan eksogen. Kontrol endogen biasanya digunakan GAPDH. Enzim ini terekspresi sangat tinggi pada hampir di semua jaringan di dalam tubuh. Biasanya GAPDH terdapat di dalam sitoplasma yang sehat. Banyak peneliti menggunakan GAPDH sebagai kontrol endogen karena menunjukkan

ekspresi RNA yang tinggi pada jaringan. Dengan kata lain, dengan meningkatnya konsentrasi total RNA dalam jaringan biasanya didukung oleh tingginya level ekspresi mRNA GAPDH dalam jaringan itu. Pada penelitian ini level ekspresi mRNA GAPDH pada otak embrio kontrol uk-12 dan perlakuan uk-12 sangat tinggi (Tabel 2 dan Tabel 3). Artinya level ekspresi mRNA enzim GAPDH tersebut, tidak menunjukkan perbedaan ekspresi antara kontrol dan perlakuan. Oleh karena itu, enzim ini dipakai sebagai kontrol endogen dalam analisis *quantitatif real time RT-PCR* (Bustin, 2000).

Perubahan level ekspresi mRNA, terjadi pada protein ekstraseluler, seperti yang telah dikatakan di atas. Hal tersebut terjadi karena fibronektin mulai muncul pertama kali pada awal setelah fase mitosis, yaitu pada masa embrionik hari ke-11 dan 12 (Stewart and Pearlman, 1987). Oleh karena itu, pada masa embrionik 10 hari, ekspresinya belum begitu tampak pada penelitian ini, namun kemudian mengalami peningkatan sejalan dengan bertambahnya umur kebuntingan mencapai 12 hari. Hal ini disebabkan oleh sel-sel neuroepitelial masih *berproliferasi*. Hasil penelitian ini didukung oleh Sheppard *et al.*, (1995), bahwa ekspresi mRNA fibronektin sangat rendah pada zona neuroepitel yang sedang *berproliferasi*, di mana pada sel yang berproliferasi, lebih mengekspresikan protein vimentin. Pada perkembangan otak, fibronektin berperan sebagai mediator melekatnya fibroblas, pergerakan beberapa sel embrionik,

**Tabel 3.** Kondisi siklus cDNA protein-protein otak embrio UK-12 hari akibat induksi 2-methoxyethanol secara *real-time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Name		Ct	Take Off	Amplification	Tm [°C]	Tm [°C]	Calc. Conc. (copies/reaction)	(copies/1Mio GAPDH)
GAPDH - brain E12 control	Sample	13.58	14.5	1.70	86.8		2,388,594	
FN1	Sample	31.61	32.8	1.76	87.4		976	409
Ncam1	Sample	20.96	22.0	1.72	87.6		97,962	41,013
Tnc	Sample	24.75	24.9	1.75	85.4		18,999	7,954
Vim	Sample	17.19	17.8	1.74	86.6		500,769	209,650
Nefh	Sample	29.18	29.8	1.72	87.4		2,793	1,169
Nefl	Sample	20.13	20.7	1.75	87.1		140,301	58,738
Nefm	Sample	21.48	22.2	1.70	89.6		78,221	32,748
GAPDH - brain E12 treated	Sample	13.84	14.3	1.70	87.1		2,134,395	
FN1	Sample	33.63	34.6	1.77	86.3		407	191
Ncam1	Sample	20.48	21.5	1.73	87.4		120,580	56,494
Tnc	Sample	21.86	22.7	1.73	85.1		66,360	31,091
Vim	Sample	15.50	16.1	1.73	86.6		1,040,579	487,529
Nefh	Sample	27.21	28.2	1.75	87.4		6,552	3,070
Nefl	Sample	19.40	20.0	1.74	87.1		192,426	90,155
Nefm	Sample	20.62	21.6	1.78	89.8		113,491	53,173

berperan dalam diferensiasi dan migrasi sel-sel, untuk perlekatan antarsel. *Fibronektin* disekresi oleh ektoderm, berperan dalam migrasi sel-sel selama proses gastrulasi (George *et al.*, 2005). Karena sel-sel masih berada dalam tahap proliferasi, maka level ekspresi mRNA fibronektin masih belum tampak dan peranannya belum diperlukan dalam fase tersebut. Berdasarkan penelitian (Viebahn *et al.*, 1988) menyatakan bahwa keberadaan ekspresi protein tampaknya berhubungan dengan fungsi seluler selama perkembangan embrionik. Jadi dapat dikatakan bahwa ekspresi fibronektin yang cenderung sangat rendah bukan disebabkan oleh pengaruh senyawa 2-ME. Mengingat pemberian 2-ME dilakukan pada uk-10 hari sementara protein fibronektin muncul setelah fase awal mitosis, yaitu uk-11 dan 12 hari.

Perubahan level ekspresi mRNA Ncam terjadi baik pada kontrol dan perlakuan. Perubahan level RNA dalam penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya, di mana pola ekspresi Ncam dan neurofilamen cenderung rendah pada otak embrio uk-10 dan pola ekspresinya berubah setelah 2 hari pemberian 2-ME (Darmanto, 2006). Seperti yang telah diketahui bahwa pemulihan jaringan yang rusak, dipengaruhi oleh invasi jaringan saraf. Invasi jaringan saraf tersebut dimulai pada embrio uk-13 hari. Jaringan saraf akan mensekresikan protein Ncam dan neurofilamen, yang diperlukan dalam proses perbaikan tersebut. Penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa Ncam dan neurofilamen merupakan protein penting untuk perkembangan organ (Nicolas *et al.*, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa kecenderungan peningkatan level ekspresi mRNA Ncam diduga bukan disebabkan secara langsung oleh pemberian 2-ME, tetapi disebabkan oleh kerusakan jaringan otak, yang memberi sinyal untuk mulai mensekresi protein, yang diperlukan untuk memperbaiki jaringan tersebut. Sehingga level ekspresi gen mRNA cenderung terus meningkat. Oleh karena proses pemulihan suatu jaringan terjadi setelah 72 jam (Ruyani, 2008), maka dalam penelitian ini, usaha pemulihan jaringan tersebut masih belum berakhir bahkan diduga, pemulihan baru dimulai, sehingga diduga bahwa level ekspresi mRNA Ncam, masih terus meningkat. Ncam berperan sebagai sinyal awal dalam interaksi saraf dengan lingkungan sekitar sel dan sel-sel mesenkim sehingga jaringan dapat memperbaiki kembali terhadap kerusakan yang terjadi. Reparasi jaringan yang rusak dilakukan melalui mekanisme proliferasi dan dediferensiasi.

Di samping itu dalam proses perkembangan jaringan yang rusak, juga dipengaruhi oleh protein Tenaskin. Munculnya ekspresi protein Tenaskin, menyebabkan sel-

sel dapat berkondensasi (Mackie *et al.*, 1987). Tenaskin merupakan substansi protein matriks ekstraseluler dan dihasilkan oleh astrosis muda selama perkembangan saraf, pada fase embrionik. Peranan Tenaskin adalah untuk memandu pertumbuhan dari saraf. Invasi saraf terjadi pada embrio uk-13 hari sehingga level ekspresi mRNA Tenaskin mungkin belum terekspresi, kemudian mulai muncul sejalan dengan peningkatan umur kebuntingan dari embrio tersebut. Dalam penelitian ini level ekspresi mRNA Tenaskin mulai tampak pada embrii kontrol uk-10 dan Peningkatan tersebut terjadi pada otak embrio perlakuan uk-12. Maka kami menduga bahwa perubahan ekspresi mRNA Ncam dan Tenaskin lebih disebabkan oleh kerusakan pada jaringan otak akibat senyawa 2-ME, sehingga memberikan sinyal terhadap ekspresi mRNA Ncam dan Tenaskin. Hal ini dibuktikan dengan mulai terekspresinya pada penelitian ini, yang kemudian cenderung meningkat. Meskipun demikian perubahan ekspresi mRNA Ncam dan Tenaskin, bukan disebabkan oleh senyawa 2-ME secara langsung, akan tetapi disebabkan oleh 2-ME secara tidak langsung, mengingat suplai saraf terjadi pada uk-13 hari, yaitu pada fase organogenesis. Jadi tingginya level ekspresi mRNA Ncam dan Neurofilamen ini, sesuai dengan fungsi seluler, yaitu untuk perbaikan jaringan akibat 2-ME. Agar proses mitosis dan dediferensiasi dalam perbaikan suatu jaringan berjalan dengan lancar. Protein tersebut diperlukan untuk kontak seluler awal dan memandu pertumbuhan saraf. Jadi level ekspresi mRNA Ncam dan Tenaskin dipengaruhi secara tidak langsung oleh 2-ME.

Pada jaringan otak, vimentin dapat dideteksi masa embrio paling awal uk-11 hari, yang merupakan stadium awal perkembangan, dan dijumpai pada serabut-serabut radial tabung neural pada sel-sel ventrikular yang sedang membelah (Schnitzer *et al.*, 1981). Proses proliferasi sel merupakan proses paling awal dalam perkembangan otak, yang terjadi pada uk-10 sampai dengan 12 hari. Pada uk-13 hari, memasuki fase organogenesis (Rugh, 1968). Kami menduga, sejalan dengan perkembangan embrio, maka protein vimentin juga terekspresi sangat tinggi, kemudian cenderung menurun pada saat memasuki fase organogenesis. Oleh Karena itu, keberadaan ekspresi protein tampaknya berhubungan dengan fungsi seluler selama perkembangan embrionik (Viebahn, 1988). Mengingat senyawa 2-ME diberikan pada induk bunting uk-10 hari dan ekspresi mulai tampak pada uk-11 hari.

Kenyataannya, level ekspresi mRNA Vimentin pada embrio kontrol uk-10 hari, cenderung tinggi. Kami menduga bahwa pemberian 2-ME menyebabkan sel-sel yang sedang aktif membelah akan memperbaiki jaringan yang rusak

akibat senyawa 2-ME sehingga sel-sel berada dalam tahap proliferasi. Data ini didukung oleh Sarnat (1998) bahwa pada sel-sel neuroepitel yang sedang membelah, mengekspresikan vimentin sangat tinggi. Vimentin dijumpai pada stadium embrionik, pada sel-sel *glial immatur* dan jaringan yang mengalami kerusakan. Pada sistem saraf yang luka, astrosit akan menjadi reaktif (Stagaard dan Mollgard, 2004). Astrosit reaktif, sangat dipengaruhi oleh keberadaan vimentin sehingga otak yang mengalami luka, menunjukkan ekspresi vimentin yang tinggi. Diduga bahwa sel-sel berusaha untuk meraparasi jaringan yang rusak melalui mekanisme dediferensiasi kembali sehingga sel berada dalam tahap proliferasi. Data ini didukung oleh Moon (2004) bahwa vimentin diperlukan dalam mereparasi jaringan otak yang luka melalui migrasi sel-sel yang aktif dan pembentukan parut jaringan. Dapat disimpulkan bahwa perubahan level ekspresi mRNA Vimentin lebih disebabkan oleh senyawa toksik, 2-methoxyethanol

Senyawa 2-ME berpengaruh langsung terhadap peningkatan level ekspresi mRNA Vimentin pada otak embrio perlakuan uk-12 hari, fase embrionik. Sementara perubahan level ekspresi mRNA Fibronektin, Neurofilamen, Tenaskin, dan Ncam bukan disebabkan oleh 2-ME secara langsung, dan keberadaannya berhubungan dengan fungsi seluler selama perkembangan embrionik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Hartmut Kühn and Dr. rar.nat Pavlos Chaitidis, dari Institut für Biochemie, Charite-Universitäts Medizin Berlin, Germany. Penelitian ini dibiayai oleh program sandwich DIKTI 2008.

## KEPUSTAKAAN

- Brown NA, Holt D, dan Webb M, 1984. The Teratogenicity of Methoxyacetic Acid in The Rat, *Toxicology Letter*, 22: 93–100.
- Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, and Walter P, 2002. *Molecular Biology of The Cell*, 4<sup>th</sup> ed.
- Bustin S, 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription Polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. Vol. 25. P. 169–93.
- Cochard P and Paulin D, 1984. Initial Expression of Neurofilament and Vimentin in the central and Peripheral Nervous System of the Mouse Embryo in Vivo. *Journal of Neuroscience*. 4: 2080–94.
- Darmanto W, 1998. Efek 2-methoxyethanol terhadap pembentukan somite dan kelainan rangka aksial pada mencit. *Proceeding Temu Ilmiah VII*, Hiroshima, Japan: p. 19–22.
- Darmanto W, Inouye M, Takagishi Y, Ogawa M, Mikoshiba K, Murata Y, 2000. Derangement of Purkinje Cells in the rat cerebellum Following Prenatal Exposure to X-Irradiation: Decreased Reelin Level is Possible Cause. *J Neurop and Exp Neurol*. 59: 245–56.
- Darmanto W, 2002. Apoptosis pada sel granulos cerebellum tikus akibat radiasi sinar-X: Deteksi apoptosis dengan metode TACS™ insitu apoptosis detection kit. *J Math and Sci*. 2002; 7(3): 133–40.
- Darmanto W, 2006. Ekspresi Neurofilament dan NCAM Secara Whole-Mount Immunohistokimia pada Embrio Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol. *Berk Penel Hayati*. p. 129–34.
- Dugard PH, Walker M, Mawdsley SJ, Scott RC, 1984. Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environ Health Perspect*; 57: 193–7.
- Dutta S, Ghosh S, Gangopadhyay PK, and Usha R, 2005. Role of Reelin in The Development of Cerebral Cortex. *J the Cell and Tissue resch*. Vol. 2. 497–505.
- Feuston MH, Kerstetter SL, and Wilson PD, 1990. Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundam Appl Toxicol*; 15: 448–56.
- Götz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schutte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Eklblom P, and Faissner A, 1996. Tenascin-C Contain distinct Adhesive and Neurite Outgrowth Promoting Site for Neuron, *The Journal of Cell Biology*, 132: 681–99.
- Hildebrand JD and Doriano P, 1999. Shroom, a PDZ domain-contacting actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell* 99, 485–97.
- Houle J and Federoff S, 1983. Temporal Relationship between Appearance of Vimentin and Neural Tube Development. *Developmental Brain Research*. 9: 189–95.
- Irnidayanti Y, 2009. Comparison of the Expression of cDNA Extra Celular Matrix Protein Between Brain E-10 Days Black-6Mice, hLN-405, rF-98 and Cell Line mHT-22, *Research Sandwich Program, Humboldt University, Berlin*.
- Lee VMY and Page C, 1984. The Dynamics of Nerve Growth Factor-Induced Neurofilament and Vimentin Filament expression and Organization in PC12 Cells. *Journal of Neuroscience*. 4: 1705–14.
- Mackie EJ, Thesleff I, and Chiquet-Ehrismann, 1987. Tenascin is Associated With Chondrogenic and Osteogenic differentiation In Vivo and Promotes Chondrogenesis In Vitro. *The Journal of Cell Biology*, 105: 2569–79.
- Miller RR, Hermann EA, Langvardt PW, McKenna J, and Schwetz BA, 1983. Comparative Metabolism and Disposition of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and Propylene Glycol Monomethyl Ether in Male Rats. *Toxic and App Pharmac*, 67: 229–37.
- Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T, 2004. Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury, *Brain Res*, 1028: 238–42



- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, William WA, 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicol*, 96: 217–24.
- Nicolas MA, Cai L, Brown DD, 2003. Thyroid hormone controls the developments between the spinal cord and limbs during *Xenopus laevis* metamorphosis, *The National Academy of Sciences of The USA*.
- Oudega M and Marani E, 1991. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system, *J. Anat*, 179: 97–114.
- Prihiyantoro E, Darmanto W, Pidada IB, Soepriandono H, 2004. Gangguan Migrasi dan Perkembangan Sel Saraf Pada Cerebrum dan Cerebelum Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol; Sebagai Model Mekanisme Kelainan Otak. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/3*.
- Rasmussen R, 2001. *Quantification on the LightCycler*. In: S. Meuer, C. Wittwer and K. Nakagawara (eds.): *Rapid cycle Real-Time PCR*. Berlin: Springer. P. 21–34.
- Rugh R, 1968. *The Mouse: Its Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Ruyani A, Sudarwati S, Sutasurya LS, Sumarsono SH, 2008. Perubahan profil protein tunas anggota tubuh depan mencit (*mus musculus*) Swiss webster akibat perlakuan dengan asam methoxyasetat (MAA), *Laboratorium Biologi Perkembangan, Institut Teknologi Bandung*.
- Sarnat HB, 1998. Vimentin Immunohistochemistry in Human Fetal Brain: Methods of standard Incubation versus Thermal Intesification Achieve Differnt Objectives. *Pediatric and Developmental Pathology*. 1: 222–9.
- Scott WJ, Fradkin R, Wittfoht W, and Nau H, 1989. Teratologic Potential of 2-Metoxyethanol and Transplacental Distribution of its Metabolite, 2-Methoxyacetic Acid, in Non-Human Primates. *Teratology*, 39: 363–73.
- Schnitzer J, Werner W, Franke, and Schachner, M, 1981. Immunocytochemical Demonstration of Vimentin in Astrocytes and Ependymal Cells of Developing and Adult Mouse Nervous System, *The journal of cell Biology*, vol. 90.
- Sheppard AM, Brunstrom JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ, 1995. Neuronal Production of Fibronectin in the Cerebral Cortex during Migration and Layer Formation Is Unique to Specific Cortical Domains, *Developmental Biology*, 172: 504–18.
- Stagaard M and Møllgard K, 2004. The developing neuroepithelium in human embryonic And fetal brain studied with vimentin-immunocytochemistry. *J. natomy and Approach*. Mc Graw Hill Book Co. Singapore.
- Stewart GR and Pearlman AL, 1987. Fibronectin-like Immunoreactivity in the developing cerebral Cortex, *Journal of Neuroscience*, 7: 3325–33.
- Steinert PM and Roop DR, 1988. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filament, *Annual Review of Biochemistry*, 57: 162–7.
- Tardy M, Fages C, Riol H, LePrince G, Rataboul P, Charriere-Bertrand C, and Nunez J, 1989. Developmental Expression og The Glial Fibrillary Acidic Protein mRNA in Te Central Nervous System and in Cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 52: 162–7.
- Taylor P, 1986. *Practical Teratology*. Academic Press. London. pp. 1–5.
- Viebahn C, Lane EB, and Ramaekers FCS, 1988. Keratin and Vimentin in Early Organogenesis of the Rabbit Embryo, *Cell Tissue Res*, 253: 553–62.

Reviewer: **Fatchiyah, Ph.D**