

EDTA Sebagai Agen Proteksi Ginjal pada Tikus yang Dipapar Timbal Asetat

A Marianti[✉], W Isnaeni, D Anatiarsara

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima 11 Januari 2018

Disetujui 23 Maret 2018

Dipublikasikan 1 April 2018

Keywords:

EDTA, Lead Expose, Renal Protective

Abstrak

Logam berat timbal (Plumbum/Pb) adalah salah satu logam berat yang bersifat toksik, dan *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) merupakan salah satu senyawa pengkhelat timbal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya proteksi EDTA terhadap ginjal tikus yang dipapar timbal (Pb) asetat per oral. Penelitian ini menggunakan *post test control group design*. Dua puluh lima ekor tikus putih galur wistar dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol (KK), kontrol negatif (KN) diberi Pb asetat 175 mg/kg BB, kelompok perlakuan (KP1, KP2, KP3) dipapar Pb asetat 175 mg/kg BB dan EDTA masing-masing 50, 150 dan 250 mg/kg BB. Perlakuan diberikan selama 30 hari. Pada hari ke-31 dilakukan pengukuran kadar Pb darah dengan AAS, kemudian tikus diterminasi dan diambil organ ginjal untuk dianalisis tingkat kerusakan jaringan ginjalnya. Data kadar Pb darah dianalisis menggunakan one way Anova dan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT), tingkat kerusakan ginjal dianalisis secara deskriptif. Hasil analisis menunjukkan penurunan kadar Pb darah dan penurunan kerusakan sel ginjal secara signifikan pada kelompok tikus yang dipapar Pb asetat dan diberi EDTA dibandingkan dengan kelompok tikus yang dipapar Pb asetat tanpa diberi EDTA. Disimpulkan, EDTA aman digunakan dan efektif mengkhelat Pb darah serta memproteksi organ ginjal pada dosis 150 mg/kg BB. Pada dosis 250 mg/kg BB, EDTA mulai bersifat toksik sehingga merusak jaringan ginjal.

Abstract

This research aims to investigate the protective effect of Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) on renal tissue in lead acetate-exposed rats via oral administration. This research applied post test control group design method for data collection. Twenty five Wistar rats were divided into five treatment groups, which are control group (KK); negative control group (KN), treated with 175 mg/kg b.w. of lead acetate; treatment groups (KP1, KP2, KP3), treated with 175 mg/kg b.w. of lead acetate and 50, 150, and 250 mg/kg b.w. of EDTA respectively. Treatment was carried out in 30 days. On the 31st day, blood lead level measurement was performed using AAS method. Rats were later terminated and had their kidney removed for further analysis in renal tissue damage. Research data were statistically analysed using one way Anova test and Duncan Multiple Range Test (DMRT). Renal damage was analysed using descriptive method. Result showed that there were significant decrease in blood lead level and renal cells damage in lead acetate-exposed rats with EDTA treatment. This result was significantly different from non-EDTA treatment. This research shows that EDTA is safety used and effective for chelating lead in rats blood in dose of 250 mg/kg b.w. and protecting rats kidney in dose of 150 mg/kg b.w. but EDTA becomes a toxic substances that damages renal tissue in dose of 250 mg/kg b.w.

© 2018 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:

E-mail: aditya.marianti.am@mail.unnes.ac.id

PENDAHULUAN

Logam berat timbal (Plumbum/Pb) adalah salah satu logam berat yang bersifat toksik jika kadarnya di dalam tubuh melebihi ambang batas yang ditetapkan *The National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) tahun 2015 yaitu sebesar 5µg/dl pada orang dewasa. Akumulasi terjadi karena Pb dapat masuk secara ingesti, inhalasi, maupun subkutan dan karena Pb²⁺ sulit dieliminasi dari tubuh. Pb²⁺ yang masuk secara oral dapat terakumulasi dalam tubuh. Pada orang dewasa, Pb²⁺ yang diabsorpsi melalui usus sekitar 5-15%. Ion Pb²⁺ yang tidak terikat pada jaringan akan diekskresikan melalui urin dan keringat. Jika kadar Pb²⁺ di dalam tubuh terlalu tinggi, maka sebagian akan dikeluarkan melalui feses. Jika feses mengandung Pb²⁺ dalam kadar yang tinggi, dapat diperkirakan sudah terjadi hiperakumulasi Pb²⁺ di dalam tubuh. Hiperakumulasi Pb²⁺ di dalam tubuh akan mengganggu fungsi tubuh dengan menimbulkan efek toksik pada setiap sistem tubuh (Cadkova *et al.* 2013; Kosnett 2012).

Efek klinis Pb²⁺ anorganik adalah defisit susunan saraf pusat, neuropati, periferan anemia, hipertensi dan nefropati. Efek dari Pb²⁺ organik adalah ensefalopati. Mekanisme toksikokinetik Pb²⁺ anorganik adalah inhibisi enzim, berinterferensi dengan kation-kation esensial, dan mengubah struktur membran dan reseptor. Sementara, efek Pb²⁺ organik mekanismenya adalah dealkilasi hepatik (cepat) membentuk metabolit trialkil (lambat) kemudian berdisosiasi menjadi Pb²⁺ (.....)

Akumulasi logam berat di dalam organ dapat mengganggu proses fisiologis tubuh secara langsung maupun tidak langsung pada tingkat molekuler. Logam berat Pb dalam bentuk ion Pb²⁺ mampu menimbulkan kerusakan oksidatif pada jaringan dan meningkatkan peroksidasi lemak, kerusakan DNA serta meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Komousani & Said 2011). Seperti dikemukakan Yushui *et al.* (2012) bahwa logam-logam berat yang bersifat toksik meningkatkan produksi radikal bebas. Proses terjadinya kerusakan akibat Pb²⁺, antara lain terjadi melalui beberapa cara, yaitu Pb²⁺ secara langsung menghambat kerja enzim, Pb²⁺ juga

dapat menghambat proses penyerapan mineral dalam tubuh. Pernyataan Yushui *et al.* (2012) ini didukung oleh Lin *et al.* (2010) bahwa selain dua hal tersebut, timbal juga dapat menurunkan kadar antioksidan. Ketidakseimbangan antara serangan oksidan dan pertahanan antioksidan pada jaringan maupun sel dapat menyebabkan kerusakan organ, dan salah satu organ yang terdampak oleh Pb²⁺ adalah ginjal.

Ginjal sebagai organ ekskresi, memainkan peranan penting dalam fungsi tubuh. Salah satu efek negatif Pb²⁺ anorganik adalah nefropati yang dapat mengganggu kerja ginjal. Untuk mencegah kerusakan organ ginjal, digunakanlah senyawa pengkhelet timbal yang aman pada saat bereaksi di dalam tubuh. Salah satu senyawa pengkhelet yang umum digunakan adalah *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA). Pada kasus pasien dengan kadar Pb darah melebihi 50µg/dl, dilakukan terapi pengkelatan dengan EDTA-kalsium-disodium (CaNa₂EDTA), dimecarpol, *D-penicillamin* dan *2,3 dimercaptosuccinic acid* (Bradberry & Vale 2009). EDTA ini biasanya diberikan dalam bentuk infus melalui intra vena pada penderita keracunan Pb²⁺. Senyawa EDTA diketahui mampu mengkhelet Pb²⁺ sehingga diharapkan akan mampu memproteksi organ ginjal dari dampak negatif akibat akumulasi Pb²⁺.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya proteksi *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) terhadap ginjal tikus yang dipapar timbal (Pb) asetat per oral.

METODE

Penelitian eksperimental laboratorium ini menggunakan *Post Test Control Group Design*. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi FMIPA UNNES. Pengujian kadar Pb darah dilakukan di Unit 1 LPPT Universities Gadjah Mada. Pembuatan preparat histopatologis organ ginjal tikus dilakukan di Laboratorium Balai Besar Veteriner Wates (BBVET Wates). Analisis histopatologis preparat ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Roemani Semarang.

Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih (rat wistar albino) jantan umur 2 bulan dan berat badan rata-rata 200 g. Tikus dibagi secara

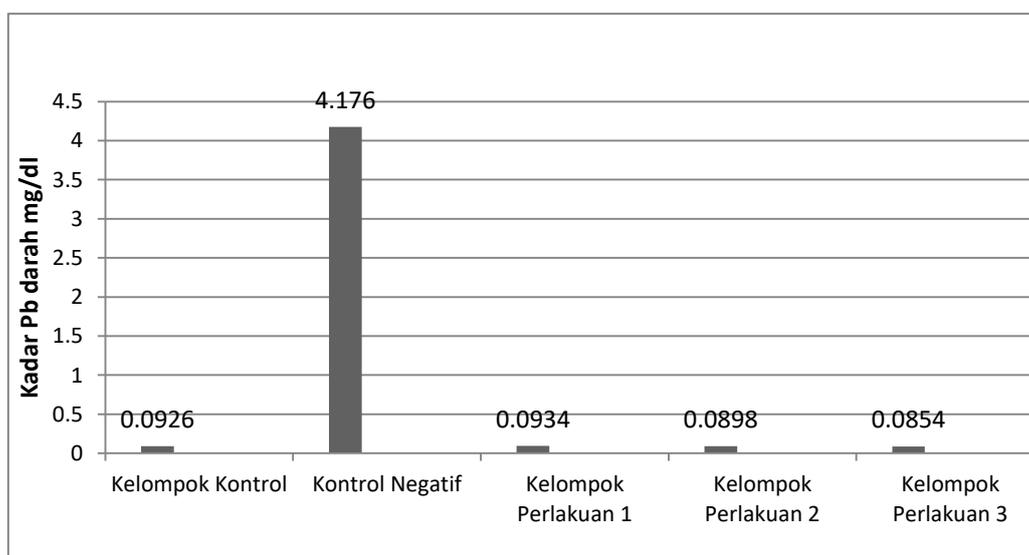
acak menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol (KK), kontrol negatif (KN), kelompok perlakuan 1 (KP1), kelompok perlakuan 2 (KP 2), kelompok perlakuan 3 (KP3). Kelompok kontrol negatif hanya diberi Pb^{2+} asetat 175 mg/kgBB, sedangkan kelompok perlakuan diberi Pb^{2+} asetat 175 mg/kgBB dan EDTA masing-masing 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 250 mg/kgBB. Tikus diberi makanan yang sama secara *ad libitum*. EDTA diberikan per oral 1x sehari, 60 menit setelah pemberian Pb asetat. Perlakuan dilakukan selama 30 hari. Pada hari ke-31, tikus diperiksa kadar Pb darahnya. Kemudian, tikus dideterminasi dan diambil organ ginjalnya untuk dibuat preparat histologis. Pembuatan preparat menggunakan metode parafin dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).

Data kadar Pb^{2+} dalam darah dan skoring kerusakan organ ginjal dianalisis secara statistik dengan Uji ANOVA. Jika hasilnya berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) 5%. Hasil foto mikroskopis organ ginjal juga dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Pb darah

Tikus kelompok kontrol negatif memiliki rerata kadar Pb darah tertinggi dibandingkan kelompok perlakuan yang lain. Kelompok tikus yang diberi Pb^{2+} asetat dan EDTA (KP1, KP2 dan KP3) menunjukkan rerata kadar Pb^{2+} dalam darah yang setara dengan kadar Pb^{2+} darah tikus kelompok kontrol (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik rerata kadar Pb^{2+} darah tikus yang dipapar Pb asetat

Hasil uji Anova satu arah menunjukkan bahwa EDTA berpengaruh nyata terhadap kadar Pb dalam darah dengan nilai signifikansi $<0,05$. Uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa pada semua kelompok perlakuan tidak ada perbedaan nyata dengan kelompok kontrol, namun berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa tubuh tikus tidak dapat bekerja maksimal mengkhelat Pb^{2+} tanpa bantuan senyawa pengkhelat. Hasil ini juga mendukung hasil penelitian Marianti *et al.* (2017) bahwa kelompok tikus yang hanya diberi Pb asetat tanpa pengkhelat menunjukkan kadar Pb darah tertinggi

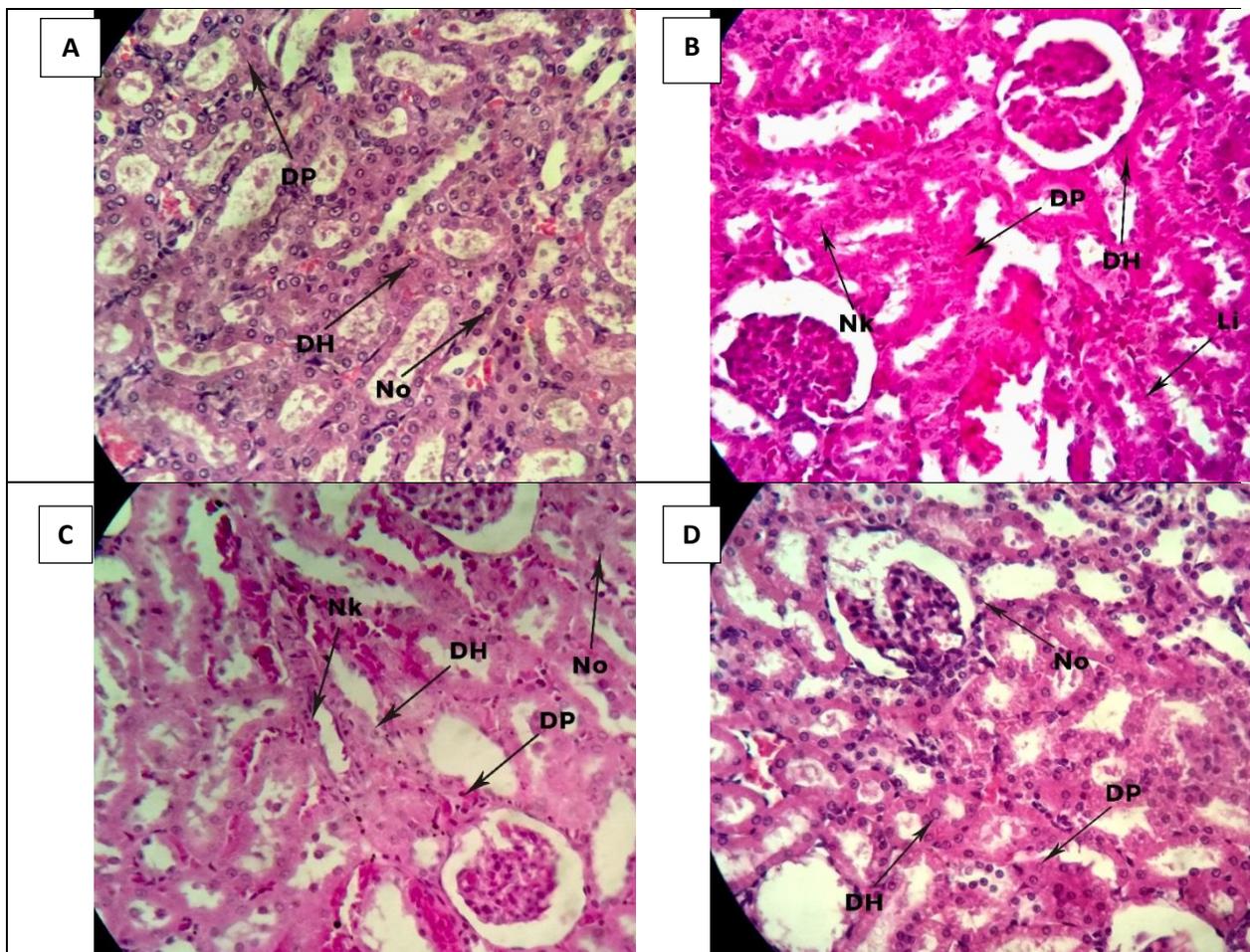
dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Dengan kata lain, kelompok tikus yang tidak mendapatkan perlindungan senyawa pengkhelat Pb^{2+} , maka tubuh hanya mengandalkan kemampuan alami dan terbukti tidak efektif dalam mengurangi kadar Pb^{2+} dalam darah. Ketidakefektifan tubuh dalam mengkhelat ion Pb^{2+} ini akan mengakibatkan terganggunya proses metabolisme tubuh. Pb yang masih ada di dalam tubuh akan mengganggu kerja senyawa penting seperti enzim. Menurut Landis *et al.* (2011), aktivitas enzim dihambat oleh timbal (Pb), karena Pb yang ada di dalam tubuh akan berikatan dengan

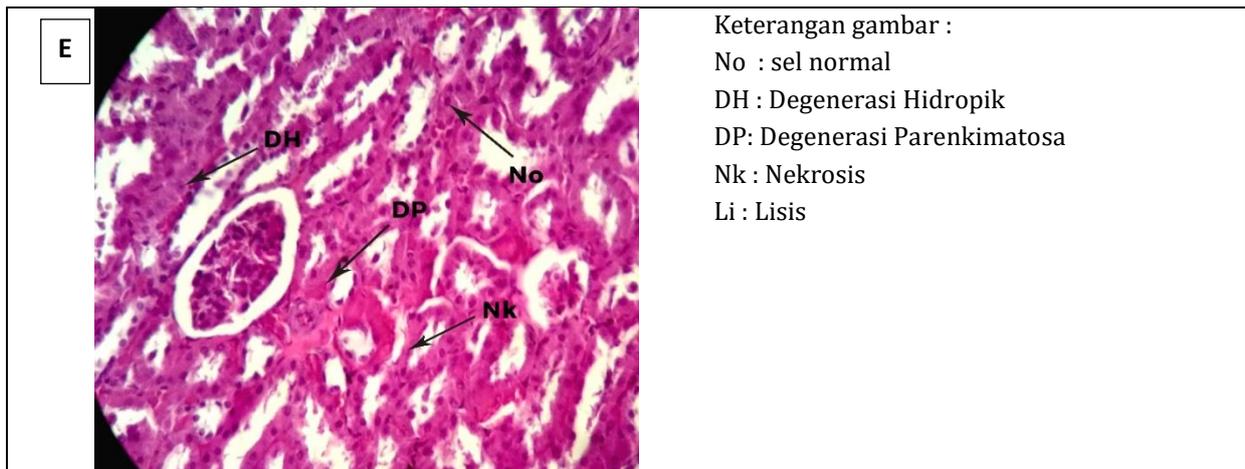
gugus sulfhidril (-SH) molekul protein. Akibatnya proses metabolisme juga terhambat. Yushui *et al.* (2012) menjelaskan bahwa senyawa Pb diketahui menyebabkan mekanisme toksisitas yang berspektrum luas. Senyawa Pb dapat menghambat kerja enzim dan penyerapan mineral. Hal ini dapat dijelaskan karena Pb sangat mudah berikatan dengan sistein, lisin dan histidin imidazol. Pb dapat berikatan dengan protein dengan menggantikan ion-ion endogen dari metalloenzim. Ikatan antara Pb dengan protein akan membentuk ikatan protein-logam yaitu metalotionin-Pb. Metalotionin-Pb yang terbentuk akan menyebabkan enzim yang berikatan dengan

protein menjadi tidak aktif. Akibat penghambatan kerja enzim, akan mempengaruhi proses-proses fisiologis dan dapat mengganggu struktur sel dalam organ.

Struktur Histopatologis Organ Ginjal

Untuk mengetahui efek protektif EDTA pada organ ginjal tikus yang dipapar Pb asetat dilakukan analisis tingkat kerusakan organ ginjal dari setiap kelompok perlakuan. Hasil pengamatan disajikan dalam bentuk gambar struktur histopatologis ginjal setiap kelompok dengan metode pewarnaan Hematoxilin Eosin dan perbesaran 400 kali.





Keterangan gambar :
 No : sel normal
 DH : Degenerasi Hidropik
 DP: Degenerasi Parenkimatososa
 Nk : Nekrosis
 Li : Lisis

Gambar 2. Gambaran histopatologis organ ginjal. A. Kelompok kontrol. B. Kelompok kontrol negatif (KN) yang diberi Pb asetat dosis 175 mg/kg BB. C. Kelompok perlakuan 1 (KP1) yang diberi Pb asetat dosis 175 mg/kg BB dan EDTA 50 mg/kg BB. D. Kelompok perlakuan 2 (KP2) yang diberi Pb asetat dosis 175 mg/kg BB dan EDTA 150 mg/kg BB. E. Kelompok perlakuan 3 (KP3) yang diberi Pb asetat dosis 175 mg/kg BB dan EDTA 250 mg/kg BB.

Hasil analisis tingkat kerusakan organ, pada kelompok kontrol memiliki rerata kerusakan jaringan organ ginjal paling sedikit dibandingkan dengan kelompok yang lain yaitu 1,1 (dari rentang 1-4) (Tabel 1). Pada kelompok kontrol ditemukan hanya sebagian kecil sel yang mengalami kerusakan. Sejumlah sel mengalami degenerasi hidropik (DH) dan degenerasi parenkimatososa (DP) dalam batas normal (Gambar 2A). Pada kelompok kontrol negatif (KN), memperlihatkan area kerusakan jaringan ginjal yang luas. Kerusakan yang terjadi adalah degenerasi parenkimatososa (albumin), degenerasi hidropik hingga nekrosis, bahkan ditemukan pula sel yang lisis (Gambar 2B). Analisis histopatologi kelompok KN menunjukkan tingkat kerusakan yang tinggi yaitu 3,4 (dari rentang 1- 4) (Tabel 1). Kerusakan ini tertinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain.

Sementara itu pada kelompok Perlakuan 1 (KP1) ditemukan skor kerusakan jaringan ginjal 2,2 (dari rentang 1-4) (Tabel 1). Pada jaringan ginjal tersebut tampak sel-sel yang mengalami degenerasi parenkimatososa (albumin), degenerasi hidropik, dan sedikit sel yang mengalami nekrosis. Beberapa sel-sel normal juga masih ditemukan (Gambar 2C). Pada kelompok perlakuan 2 (KP2) ditemukan sejumlah sel ginjal normal, dan sedikit sel yang mengalami degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik dan sedikit sel nekrosis (Gambar 2D). Sel-sel yang diamati secara umum

menunjukkan kondisi hampir sama dengan gambaran sel-sel ginjal pada kelompok kontrol. Rerata skoring tingkat kerusakan sel pada kelompok ini adalah 1,2 (dari rentang 1-4) (Tabel 1). Pada kelompok perlakuan 3 (KP3), ditemukan sejumlah sel ginjal normal, beberapa sel yang mengalami degenerasi parenkimatososa maupun degenerasi hidropik. Jumlah sel yang mengalami nekrosis ditemukan dalam jumlah banyak (Gambar 2E). Rerata skoring tingkat kerusakan sel pada kelompok ini adalah 3,1 (dari rentang 1-4) (Tabel 1).

Hasil uji Anova *one way* skoring kerusakan organ ginjal diperoleh nilai F 9,831 dengan signifikansi <0,05. Hasil ini menunjukkan pengaruh nyata EDTA terhadap kerusakan organ ginjal. Hasil uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf 5% (Tabel 1) menunjukkan bahwa kerusakan tertinggi terjadi pada kelompok KN dan KP3. Kerusakan tersebut disebabkan ion Pb^{2+} yang berasal dari Pb asetat mampu menggantikan tempat kation bivalen seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} dan kation monovalen yang secara langsung dapat mengganggu metabolisme sel (Jaishankar *et al.* 2014). Mekanisme toksisitas Pb menyebabkan perubahan signifikan pada berbagai proses biologis seperti adhesi sel, sinyal intraseluler dan ekstraseluler, mengganggu aktivitas protein, maturasi, apoptosis, transportasi ionik, regulasi enzim, dan pelepasan neurotransmitter. Akibat berbagai gangguan ini

akan menstimulasi terjadinya kerusakan sel-sel ginjal. Kondisi ini juga diperparah dengan aktivitas ion Pb^{2+} sebagai radikal bebas sehingga meningkatkan ROS. ROS menyebabkan kerusakan struktural pada sel, protein, asam nukleat, membran sel dan lipid, serta menyebabkan kondisi stres pada tingkat seluler (Jaishankar *et al.*, 2014).

Ibrahim *et al* (2012) menyatakan bahwa ROS yang dihasilkan oleh reaksi degeneratif jaringan akan menimbulkan efek pada metabolisme reguler dengan merusak komponen sel. Terjadinya stres pada tingkat seluler merupakan faktor utama yang berkontribusi pada kerusakan sel.

Tabel 1. Data skoring kerusakan organ ginjal tikus

Kelompok	Skoring Kerusakan Ginjal (Rerata \pm SD)	Keterangan
K	1,1 \pm 0,22361 ^a	Kontrol
KP2	1,2 \pm 0,27386 ^{ab}	EDTA dosis 150 mg/kg BB
KP1	2,2 \pm 0,57009 ^{bc}	EDTA dosis 50 mg/kg BB
KP3	3,1 \pm 1.34164 ^d	EDTA dosis 250 mg/kg BB
KN	3,4 \pm 0,82158 ^d	Kontrol Negatif

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang tidak sama menunjukkan perbedaan signifikan

Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa pada KP1 dan KP2, tingkat kerusakannya tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol (KK). Kondisi ini disebabkan oleh ligan bebas pada EDTA akan mengikat ion Pb^{2+} yang telah berubah menjadi radikal bebas. Pengikatan ion Pb^{2+} oleh EDTA menyebabkan inaktivasi radikal bebas. Hal ini menyebabkan menurunnya ROS. Sementara, pada kelompok KP3 menunjukkan bahwa EDTA pada dosis 250 mg/kg BB tidak dapat melindungi organ ginjal dari Pb asetat, meskipun secara signifikan mampu menurunkan kadar Pb^{2+} darah. Hal ini disebabkan EDTA yang sebelumnya bekerja menurunkan ROS, akan bekerja sebaliknya yaitu menaikkan ROS. ROS merupakan salah satu faktor pemicu gangguan metabolisme tubuh hingga kerusakan sel. ROS yang meningkat akibat kadar EDTA yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan mitokondria. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa stres oksidatif pada sel disebabkan oleh ketidakseimbangan produksi radikal bebas dan antioksidan untuk mendetoksifikasi dan untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi (Jaishankar *et al.* 2014).

SIMPULAN

Pemberian EDTA dosis 150 mg/kg BB aman digunakan dan paling efektif mengkhelat ion Pb^{2+} sehingga mampu menurunkan kadar Pb^{2+} darah dan memproteksi ginjal tikus yang dipapar Pb^{2+}

asetat. EDTA pada dosis 250 mg/kg BB mampu menurunkan kadar Pb darah namun mulai bersifat toksik dan tidak mampu memproteksi ginjal.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek tingginya kadar Pb^{2+} dalam darah tikus terhadap kerusakan organ lainnya baik struktur maupun fungsinya. Semakin tinggi dosis EDTA dapat menimbulkan efek toksik, sehingga perlu dicari bahan pengkhelat logam berat yang lebih aman dari EDTA.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradberry S & Vale A. 2009. Dimercaptosuccinic acid (succimer; DMSA) in inorganic lead poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*.47(7):617-31.
- Cadkova Z, Száková J, Míhlová D, Válek P, Pacáková Z, Vadlejch J, Langrová I, & Jankovská I. 2013. Faecal excretion dynamic during subacute oral exposure to different Pb^{2+} species in *Rattus norvegicus*. *Biol Trace Element Res* 152:225-232
- Ibrahim NM, Eweis EA, El-beltagi HS, & Abdel-mobdy YE. 2012. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2(1): 41-6.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, & Beeregowda KN. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscipl Toxicol*. 7(2): 60-72.
- Komousani TA & Said SM. 2011. Modulation of lead biohazards using a combination of epicatechin

- and lycopene in rats. *Hum Exp Toxicol* 30(10): 1674-81.
- Kosnett MJ. 2012. *Heavy Metals Intoxication and Chelators (Chapter 57). Basic and Clinical Pharmacology*. 12th edition. Editor Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Mc GrawHill Companies Inc. p: 1013-17.
- Landis WG, Solfield RM, & Ming-Hoyu. 2011. *Introduction to Environmental Toxicology Molecular Substructures to Ecological Landscapes* 4th Edition. CRC Press Taylor & Franciss Group
- Lin W, Zengyong W, & Jianzhu L. 2010. Protective effect of N-acetylcysteine on experimental chronic lead nephropototoxicity in immature female rats. *Hum Exp Toxicol* 29(7): 581-91.
- Marianti A, Anatasara D & Ashar FF. 2017. Chitosan as chelating and protective agents from lead intoxication in rat. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education* 9(1): 126-133
- Yushui M, Da F, & Zongping L. 2012. Effect of lead an apoptosis in cultured rat primary osteoblast. *Toxicol Ind Health*. 28(2): 136.