

UPTAKE ^{64}Cu OLEH LAPISAN MUKOSA USUS MENCIT IN-VITRO

F.X. Sutomo

Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

UPTAKE ^{64}Cu OLEH LAPISAN MUKOSA USUS MENCIT IN-VITRO. Telah dipelajari uptake ^{64}Cu oleh lapisan mukosa usus secara in-vitro dengan menggunakan teknik kantung terbalik (everted sac technique) dari segmen duodenal usus mencit. Percobaan ini dilakukan untuk melihat uptake ^{64}Cu pada waktu dan temperatur inkubasi yang berbeda, serta pengaruh penambahan seng dalam diet terhadap uptake ^{64}Cu dan distribusi ^{64}Cu dalam mukosa. Digunakan modifikasi larutan dapar Krebs Ringer (mKRB) sebagai medium, yaitu dengan penambahan Glycine (1 mmol/L) dan Glukosa (5 mmol/L). Kantung terbalik diisi dengan medium mKRB dan diprainskubasi selama 5 menit dalam 10 mL mKRB pada temperatur 37°C dalam penangas air bergoyang. Larutan mKRB yang mengandung ^{64}Cu digunakan dalam proses inkubasi dan aktivitas spesifiknya adalah 1 mL/2,5 $\mu\text{Ci}/1\mu\text{g}$ tembaga. Hasil percobaan menunjukkan bahwa uptake ^{64}Cu pada temperatur inkubasi 0°C terhambat. Pada temperatur 37°C terlihat adanya suatu kenaikan uptake yang tampaknya linier untuk berbagai waktu inkubasi. Tidak terlihat adanya perbedaan uptake ^{64}Cu oleh lapisan mukosa antara mencit kontrol (24,8 \pm 4,6 ng tembaga/ mg protein) dengan mencit perlakuan (25,6 \pm 9,8 ng tembaga / mg protein), yaitu yang mendapatkan tambahan seng-asetat 80 ppm selama 7 hari di dalam air minumnya. Namun ternyata distribusi ^{64}Cu di dalam lapisan mukosa pada kedua kelompok tersebut menunjukkan pola yang berbeda. Pada mencit kontrol, ^{64}Cu di dalam lapisan mukosa terikat tidak saja pada suatu ligan pengikat tembaga yang diduga suatu jenis protein yaitu Metallothionein (86,58 \pm 3,95 %), tetapi juga pada protein lain (13,41 \pm 3,95 %) yang mempunyai berat molekul yang tinggi (High Molecular Weight Protein). Sebaliknya pada mencit perlakuan, ^{64}Cu di dalam lapisan mukosa hampir semuanya terikat pada protein Metallothionein (98,38 \pm 0,79 %). Hal ini mungkin merupakan suatu mekanisme yang menyebabkan seng dalam diet menurunkan absorpsi tembaga.

ABSTRACT

UPTAKE OF ^{64}Cu BY MOUSE INTESTINAL MUCOSA IN-VITRO. Everted mouse duodenal segments, tied into sacs were used to study the uptake of ^{64}Cu in-vitro by mouse intestinal mucosa. The experiment was carried out to see the uptake of ^{64}Cu on the different time and temperature of incubation as well as the effect of dietary zinc suppletion upon the uptake of ^{64}Cu and the distribution of ^{64}Cu in the mucosa. Modified Krebs Ringer buffer solution (mKRB) was used as medium, to which 1 mmol/L of Glycine and 5 mmol/L of Glucose were added. Everted sacs were filled with mKRB and were pre-incubated during 5 minutes in 10 mL mKRB at 37°C in a shaking water bath. mKRB containing ^{64}Cu was used in the process of incubation and the specific activity was 1 mL/2.5 $\mu\text{Ci}/1\mu\text{g}$ copper. The results indicated that the uptake of ^{64}Cu at 0°C was inhibited. At 37°C however, different incubation time gave different uptakes, with almost linear relationship. The sacs taken from animals treated with 80 ppm of zinc-acetate in drinking water for 7 days did not show different uptake of ^{64}Cu (25.6 \pm 9.8 ng copper/mg protein) compared with that of the control group (24.8 \pm 4.6 ng copper/mg protein). But the distribution of ^{64}Cu in the mucosa showed a different pattern. The data indicated that ^{64}Cu in control animals was bound not only to a copper binding ligand probably Metallothionein (86.58 \pm 3.95 %) but also to the High Molecular Weight Protein (HMWP, 13.41 \pm 3.95 %). On the other hand, almost all the ^{64}Cu from the treated animals was bound to the Metallothionein (98.38 \pm 0.79 %). This may be a possible mechanism by which dietary zinc decreases copper absorption.

PENDAHULUAN

Tembaga merupakan bagian dari enzim yang disebut sebagai Metalloenzim. Peranan fisiologis unsur runutan ini telah banyak diketahui pada hewan mamalia (1).

Usus kecil memegang peranan yang penting pada proses pengaturan keseimbangan tembaga dalam tubuh melalui pengaruh unsur runutan lain terhadap Metallothionein usus,

yang selanjutnya akan menahan proses pemindehan tembaga ke serum darah (2). Fischer (3) telah mempelajari tentang mekanisme interaksi antara seng dan tembaga secara in-vitro dengan menggunakan usus kecil tikus.

Proses penghambatan absorpsi tembaga banyak dipelajari terutama dengan menggunakan kadar seng tinggi di dalam diet/makanan (4).

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui *uptake* ^{64}Cu oleh lapisan mukosa duodenum mencit serta untuk menentukan pengaruh seng dalam jumlah yang relatif rendah yang diberikan dalam waktu tertentu terhadap *uptake* ^{64}Cu , dan juga terhadap distribusi tembaga antara Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein*. Hal yang terakhir ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang mekanisme hambatan oleh seng terhadap absorpsi tembaga.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan

Hewan percobaan

Mencit jantan galur Swiss (HSD/CPB:SE) dengan berat badan berkisar antara 18 - 19 gram diperoleh dari Harland/CPB (Zeist, Belanda). Hewan dipelihara di dalam kandang Macrolon dengan dasar kasa tahan karat selama 2 minggu untuk proses adaptasi. Makanan yang digunakan adalah IRI-CB diet produksi Hope Farms (Woerden, Belanda) mengandung 21 ppm seng dan 13 ppm tembaga. Ruangan pemeliharaan hewan diatur sedemikian rupa sehingga temperatur ruangan terkontrol yaitu $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban 55% dan penerangan yang bergiliran setiap 12 jam (12 jam menyala, 12 jam padam). Air minum yang digunakan adalah *demineralized water* dan diberikan secara *ad libitum*. Jika diperlukan untuk percobaan, seng ditambahkan ke dalam air minum dalam bentuk seng asetat, dengan konsentrasi 80 ppm. Rata-rata 5 gram makanan dan 4-5 mL air minum dikonsumsi per ekor per hari.

Tembaga radioaktif

^{64}Cu dibuat dengan cara meradiasi 3 mg tembaga (Ventron, Karlsruhe, FRG: 99,999%) selama 12 jam dalam reaktor dengan fluks termal $1.2 \times 10^{17} \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ di Interfaculty Reactor Institute, Delft, Belanda. Hasil radiasi ini kemudian dilarutkan ke dalam 25 μL HNO_3 pekat dan diencerkan dengan 3 mL 50 mM larutan dapar Na-asetat, pH 5,6 yang mengandung 0,6% NaCl.

Pada akhirnya 1 mL larutan mengandung 1 mg tembaga dan 4,5 mCi ^{64}Cu .

Larutan inkubasi

Digunakan larutan dapar Krebs Ringer bikarbonat (5) yang dimodifikasi (=mKRB) dan dialiri campuran CO_2 dan O_2 masing-masing 5% dan 95% dan pH larutan adalah 7,4. Larutan ini terdiri dari NaCl (118 mmol/L), NaHCO_3 (25 mmol/L), KCl (4 mmol/L), KH_2PO_4 (1,1 mmol/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,1 mmol/L), Glycine (1 mmol/L) dan Glukosa (5 mmol/L).

Penyiapan jaringan

Tiga puluh enam ekor mencit jantan galur Swiss (HSD/CPB:SE) digunakan sebagai donor usus. Sebelum digunakan hewan dipuaskan lebih dahulu semalam tetapi masih diberikan air minum *ad libitum*. Hewan dibunuh dengan menggunakan gas CO_2 , kemudian segera diambil usus kecilnya, lalu ditempatkan di dalam larutan mKRB dingin. Selanjutnya usus kecil dibersihkan isinya dengan menggunakan larutan mKRB, kemudian dibuat kantung terbalik dari segmen yang dikehendaki (5). Sebuah batang gelas dimasukkan ke dalam lumen usus, kemudian pada bagian ujungnya diikat dengan benang halus. Preparat ini kemudian secara perlahan-lahan dan hati-hati dibalik, bagian luar menjadi bagian dalam dengan cara mendorong batang gelas tersebut ke arah yang berlawanan. Segmen usus yang sudah terbalik ini dipisahkan dari batang gelas dan salah satu ujungnya diikat dengan benang halus dan kemudian segmen terbalik ini diisi dengan larutan mKRB menggunakan jarum suntik yang dimasukkan lewat bagian ujung yang terbuka. Setelah diisi dengan larutan mKRB, ujung yang terbuka tersebut diikat dengan benang halus dan kantung terbalik yang telah berisi larutan mKRB ini disimpan di dalam larutan mKRB dingin dan siap digunakan untuk percobaan in-vitro.

Tata Kerja

Percobaan 1

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengetahui pengaruh waktu dan temperatur inkubasi terhadap *uptake* ^{64}Cu oleh lapisan sel mukosa.

Digunakan 24 ekor mencit jantan galur Swiss (HSD/CPB:SE) sebagai donor organ. Kantung terbalik dibuat dari segmen proksimal usus kecil (duodenum), masing-masing dengan panjang 5 cm. Kantung ini diprainkubasikan selama 5 menit di dalam 10 mL larutan mKRB

pada temperatur 37°C dengan menggunakan penangas air yang bergoyang, dan kemudian diinkubasikan di dalam 10 mL larutan mKRB yang mengandung 25 μCi ^{64}Cu dan 10 μg tembaga.

Delapan belas kantung terbalik diinkubasi pada temperatur 37°C selama 3, 10, dan 30 menit (masing-masing 6 preparat), sedangkan 6 kantung terbalik diinkubasikan pada temperatur 0°C selama 3 dan 30 menit (masing-masing 3 preparat). Setelah proses inkubasi selesai, setiap kantung terbalik dicuci 3 kali dengan menggunakan larutan mKRB dingin sambil digoyang. Kemudian kantung dibuka pada salah satu ujungnya, dikeluarkan isinya dan sisa larutan yang menempel dikeringkan dengan menggunakan kertas penyerap. Sel-sel mukosa diambil dari lapisan luar kantung (lapisan mukosa) menggunakan kaca obyek dengan cara dikerik dan kemudian dikumpulkan. Dilakukan analisis kandungan protein dalam sel-sel mukosa tersebut dengan metode Lowry. Kandungan ^{64}Cu dalam sel-sel mukosa dicacah dengan menggunakan Packard Gamma Counter dan hasilnya dihitung dalam satuan ng tembaga per mg protein.

Percobaan 2

Percobaan ini bertujuan untuk menentukan pengaruh pemberian seng dalam jumlah yang relatif rendah (80 ppm) selama 7 hari terhadap *uptake* ^{64}Cu serta distribusinya antara Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein*. Dua belas ekor mencit jantan galur *Swiss* (HSD/CPB:SE) digunakan sebagai donor organ. Setelah proses adaptasi selama 2 minggu, satu kelompok mencit yang terdiri dari 6 ekor mendapatkan tambahan seng 80 ppm di dalam air minumnya dalam bentuk seng-asetat selama 7 hari. Sedangkan 6 ekor dari kelompok lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Kantung terbalik dari kedua kelompok mencit tersebut dibuat seperti pada percobaan 1. Setelah proses pra-inkubasi selama 5 menit pada temperatur 37°C, kantung terbalik kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada temperatur yang sama di dalam 10 mL larutan mKRB yang mengandung 25 μCi ^{64}Cu dan 10 μg tembaga. Selanjutnya kantung terbalik ini diperlakukan sama seperti pada percobaan 1 guna mendapatkan sel-sel mukosa.

Pada sel-sel mukosa yang sudah dikumpulkan dari masing-masing kantung terbalik ditambahkan 1 mL 10 mM larutan dapar Tris asetat dan kemudian dihomogenkan dengan ca-

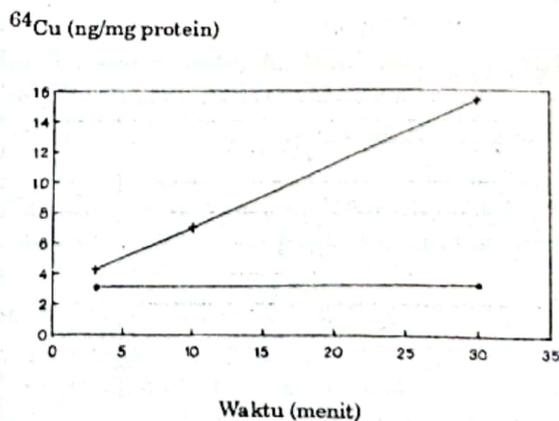
ra didinginkan dengan nitrogen cair kemudian dibiarkan pada temperatur kamar secara bergantian. Sejumlah 0,2 mL larutan ini digunakan untuk mengukur *uptake* ^{64}Cu oleh sel-sel mukosa, dengan menggunakan Packard Gamma Counter. Sisa dari homogenat yang ada kemudian disentrifugasi pada kecepatan 100.000 x g selama 30 menit. Supernatan yang didapat dikromatografi dengan menggunakan Sephacryl 200 S - HR (Pharmacia-Uppsala, Sweden) pada kolom ukuran 1,6 x 30 cm, menggunakan eluen 10 mM larutan dapar Tris asetat yang mengandung 0,6% NaCl, pH 7,4 dan dengan laju kecepatan 1,5 mL per menit (Vrioperpex II Pump 2120). Fraksi sejumlah 1,5 mL dikumpulkan dengan menggunakan Fraction Collector model 2112 Radirac, LKB Bromma dan kemudian dicacah dengan menggunakan Packard Gamma Counter.

Untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil yang didapat antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dilakukan perhitungan uji statistik Student's-t-test seperti yang telah umum digunakan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian terhadap kemungkinan terjadinya presipitasi akibat reaksi tembaga dengan fosfat yang ada di dalam medium yang digunakan yaitu dengan cara sentrifugasi menunjukkan bahwa penambahan glisin ke dalam medium telah dapat mengatasi kemungkinan tersebut. Dengan demikian penambahan ^{64}Cu tidak merubah keadaan medium.

Hasil percobaan 1 dapat dilihat pada Gambar 1. Terlihat adanya gejala hambatan *uptake*



Gambar 1. Uptake ^{64}Cu oleh lapisan mukosa duodenum pada waktu dan temperatur inkubasi yang berbeda.

^{64}Cu pada temperatur inkubasi 0°C . Keadaan ini sama seperti apa yang dinyatakan oleh Middleton III (5) pada percobaan mengenai absorpsi riboflavin oleh usus tikus. Pada temperatur inkubasi 37°C dengan waktu inkubasi 3 menit hingga 30 menit terlihat adanya kenaikan *uptake* ^{64}Cu oleh sel-sel mukosa duodenum mencit. Kenaikan ini tampaknya linier seperti yang terlihat pada Gambar 1.

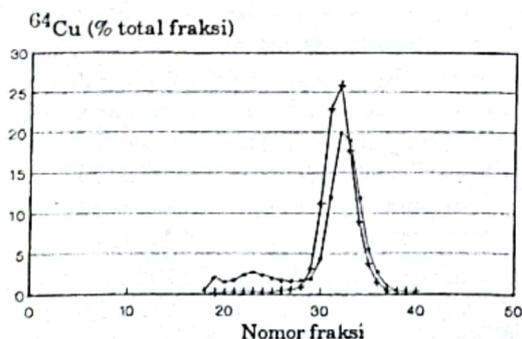
Waktu inkubasi selama 30 menit pada percobaan selanjutnya dipilih berdasarkan percobaan in-vitro yang telah dilakukan oleh Fischer dan kawan-kawan (3).

Uptake ^{64}Cu oleh sel-sel mukosa duodenum, persentase ikatan ^{64}Cu pada Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein* dalam sel mukosa duodenum dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. *Uptake* ^{64}Cu oleh lapisan mukosa serta persentase ikatannya pada Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein*.

Kelompok n=5	^{64}Cu		
	<i>Uptake</i> protein (ng/mg)	HMWP (%)	MT (%)
Kontrol	$24,8 \pm 4,6$	$13,4 \pm 3,9$	$86,6 \pm 3,9$
Perlakuan	$25,6 \pm 9,8$	$1,7 \pm 0,8$	$98,4 \pm 0,8$

Gambar 2 menunjukkan pola distribusi ^{64}Cu antara Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein*.



Gambar 2. Pola distribusi ^{64}Cu dalam Metallothionein (MT) dan *High Molecular Weight Protein* (HMWP) dari kelompok kontrol (.) dan kelompok perlakuan (+).

Penentuan fraksi yang mengandung ^{64}Cu yang terikat pada Metallothionein dan *High Molecular Weight Protein* pada percobaan ini dilakukan dengan cara gel kromatografi dan dicacah dengan alat pencacah gamma seperti pada (6 - 9).

Uptake ^{64}Cu oleh sel-sel mukosa duodenum dari hewan kelompok kontrol dan hewan kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Tidak demikian halnya dengan ^{64}Cu yang terikat pada protein sel mukosa. Ternyata persentase ikatan ^{64}Cu pada Metallothionein dari kelompok perlakuan lebih tinggi dan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dengan kelompok kontrol. Sebaliknya persentase ikatan ^{64}Cu pada protein dengan berat molekul yang lebih tinggi dari Metallothionein (*High Molecular Weight Protein*) sangat menurun pada kelompok perlakuan dan juga berbeda sangat nyata dengan kelompok kontrol ($P < 0,01$). Hasil yang didapat ini ternyata sejalan dengan apa yang telah dilaporkan oleh para peneliti sebelumnya. Oestreicher dan Cousins (10) dengan menggunakan metode perfusi usus kecil tikus melaporkan bahwa kadar tembaga di dalam cytosol sel mukosa tetap hampir tidak berubah dalam responnya terhadap kandungan seng di dalam diet/makanan. Namun kenaikan konsentrasi seng di dalam diet/makanan menyebabkan naiknya kadar Metallothionein di dalam sel mukosa usus. Fischer (3) melaporkan bahwa absorpsi tembaga akan menurun sebagai respon terhadap tingginya kandungan seng dalam diet/makanan. Dengan percobaan in-vitro menggunakan kantung terbalik dari usus kecil tikus dilaporkan adanya suatu korelasi antara menurunnya absorpsi tembaga dengan terbentuknya Metallothionein di dalam sel mukosa usus. Hipotesis yang diajukan adalah bahwa seng menginduksi sintesa Metallothionein dan tembaga yang masuk ke dalam sel mukosa akan menggantikan seng yang terikat pada protein tersebut. Oleh karena tembaga lebih kuat terikat pada Metallothionein daripada seng, maka tembaga yang terikat ini menjadi tidak berperan didalam perpindahannya keluar dari sel mukosa ke serum darah, sehingga akan menyebabkan turunnya absorpsi tembaga. Lebih lanjut Fischer (8) menyatakan bahwa dengan terbentuknya lebih banyak Metallothionein maka tembaga yang terikat pada *High Molecular Weight Protein* menjadi berkurang. Protein inilah yang berperan dalam proses perpindahan tembaga dari sel mukosa ke serum darah. Dengan demikian diperkirakan bahwa absorpsi

tembaga mencakup 2 tahapan yaitu tahapan *uptake* tembaga oleh sel-sel mukosa usus dan tahapan perpindahannya dari sel mukosa tersebut ke dalam serum darah.

Dari hasil percobaan ini dapatlah dikatakan bahwa pemberian seng hanya sebesar 80 ppm selama 7 hari telah mampu menunjukkan adanya gejala perubahan pola distribusi ^{64}Cu di dalam sel mukosa duodenum mencit. Tampaknya hal ini dapat mengakibatkan proses absorpsi tembaga akan menurun akibat mekanisme antagonistik antara seng dan tembaga.

KESIMPULAN

Temperatur dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap *uptake* ^{64}Cu oleh lapisan mukosa duodenum mencit. Pemberian unsur runtuhan seng dalam bentuk seng asetat di dalam air minum sebesar 80 ppm selama 7 hari tidak mempengaruhi *uptake* ^{64}Cu dari lumen duodenum mencit. Namun terlihat bahwa pola distribusi ^{64}Cu di dalam sel mukosa dari duodenum mengalami perubahan. Persentase ikatan ^{64}Cu pada Metallothionein naik, tetapi sebaliknya pada protein dengan berat molekul yang lebih tinggi (High Molecular Weight Protein) persentase ikatan ini turun. Gejala ini tampaknya

merupakan suatu mekanisme penghambatan absorpsi tembaga oleh lapisan mukosa duodenum akibat terikatnya tembaga oleh Metallothionein, sehingga proses pemindahan tembaga dari sel mukosa ke serum darah menurun.

PERNYATAAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.C.J.A. van den Hamer, pakar pada Departemen Radiokimia, Interfaculty Reaktor Institute, IRI - Delft, Belanda yang telah memberikan bimbingan, bantuan dan perhatian yang demikian besar selama percobaan ini. Tanpa bantuan beliau percobaan ini tak akan dapat diselesaikan sesuai dengan program yang direncanakan. Ucapan terima kasih penulis sampaikan pula kepada rekan-rekan di Bagian Biologi Nuklir IRI terutama kepada Mr. J.J.Kroon yang telah dengan kesungguhan hati membantu penyediaan ^{64}Cu selama percobaan ini. Juga kepada Drs. G.J. van den Berg yang telah membantu didalam penyediaan IRI - CB diet dan hewan percobaan. Akhirnya penulis mengucapkan terimakasih kepada Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi - BPPT yang telah memberikan biaya dalam rangka karyasiswa Overseas Fellowship Program (OFP).

DAFTAR PUSTAKA

1. Solomon, N.W., Biochemical, metabolic, and clinical role of copper in human nutrition, *J. Am. Coll. Nutr.*, 4 (1985) 83-105.
2. Brewer, G.J., Yusbasiyan, V.A., Iyengar, V., Hill, G.M., Dick, R.D., and Prasad, A.S., Regulation of copper balance and its failure in humans., *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease.*, (1988) 95 - 103
3. Fischer, P.W.F., Giroux, A. and L'Abbe, M.R., The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption, *Am.J. Clin. Nutr.*, 34 (1981).
4. Ogiso, T., Moriyama, K., Sasaki, S., Ishimura, Y., and Minato, A., Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 22 (1974) 55 - 60..
5. Middleton III, H.M., Uptake of ribflavin by rat intestinal mucosa in-vitro, *J. Nutr.*, 10 (1990) 588 - 593.
6. Dielhof, J. B. van der Enden, J.G., Stolk, Th, M.W., and van den HAMER, C.J.A., High molecular weight zinc and copper binding proteins in the liver of the rat : Effect of centrifugation, *Inor.Chim.Act.*, 135 (1987) 129 - 132.
7. Evan, G.W., Metallothionein in intestinal copper metabolism, *Exp.Suppl.*, 34 (1979) 321 - 329.
8. Fischer, P.W.F., Giroux, A., and L'Abbe, M.R., Effects of zinc on mucosal copper binding and on the kinetics of copper absorption, *J. Nutr.*, 113 (1983) 462 - 469.
9. Ogiso, T., Ogawa, N. and Miura, T., Inhibitory effect of high dietary zinc and copper absorption in rat II. Binding of copper and zinc to cytosol proteins in the intestinal mucosa, *Chem.Pharm. Bull.*, 27 (1979) 515 - 521.
10. Oestreicher, P. and Cousins, R.J., Copper and zinc absorption in the rat: Mechanism of mutual antagonism, *J.Nutr.*, 115 (1985) 159 - 166.