

## Katekin dalam Teh Hijau sebagai Kelator Alami pada Individu Terpapar Plumbum Pembawa Polimorfisme Gena Nitrit Oksida Sintase 3

Hernayanti<sup>1</sup>, Sukarti Moeljopawiro<sup>2</sup>, Ahmad Hamim Sadewa<sup>3</sup>, Nurtjahjo Dwi Sasongko<sup>1</sup>  
Hexa Apriliana Hidayah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman

<sup>2</sup> Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Email: hernayantioentoro@gmail.com

### Abstract

Green tea is one type of tea which extensively used to treat many kind of disease such as hypertension. Green tea have a high contain antioxidant called catechin. Catechin can act as a radical scavenger for free radicals such as singlet oxygen, hydroxyl radicals and peroxy nitrite. Based on its benefits, catechin can eliminate heavy metal i.e lead in human body, especially for lead-exposed individual i.e car autorepair shop workers. Chelation is the treatment of choice in lead poisoning. This treatment usually use a chemical chelating agent like dimercaprol, but it has side effect like hypertension. The objective of these studies were to know (1) the effect of green tea on NO level in lead-exposed individual with NOS3 gene polymorphism and non polymorphisms (2) The effect of green tea on systolic and diastolic in lead-exposed individual with polymorphisms gene NOS3 and non polymorphisms. The studies using a survey method with a cohort design. These subject were 30 car autorepairs hop workers as cases subject and 30 control subject from Pamijenvillage. The genotype individu NOS3 genopolymorphisms investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR)- Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) with Mbol restricted enzyme. Parameter recorded were blood lead, nitric oxide level, systolic and diastolic blood pressure. Data were analyzed by pair t-test. These results showed that 40% of 30 cases subject were detected as polymorphisms individual of gene NOS3, with GA genotype. Mbo-I enzyme cut their DNA become 206 bp, 119 bp and 87 bp. As many as 60% of 30 cases subject were detected as non polymorphisms individual with GG genotype. NO level both on the individual of polymorphisms gene NOS3 and non polimorphisms were increased and their systolic and diastolic blood pressures were decreased. This research can be concluded that green tea has an activity as a chelator agent for lead.

**Key words** : Lead, Nitric Oxide, Systolic and diastolic blood pressure

### Abstrak

Teh hijau merupakan salah satu jenis teh yang banyak dikenal karena berkhasiat untuk menyembuhkan berbagai penyakit contohnya hipertensi. Daun teh hijau mengandung senyawa polifenol yang dikenal sebagai catechin. Catechin dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas seperti senyawa singlet oksigen, radikal hidroksil dan peroksinitrit. Berdasarkan sifat tersebut catechin diharapkan dapat mengatasi keracunan logam berat Pb pada individu terpapar Pb. Pengobatan keracunan Pb selama ini menggunakan senyawa kelator kimiawi dimercaprol, namun dilaporkan pemakaiannya menimbulkan efek samping berupa naiknya tekanan darah. Tujuan penelitian ini untuk 1) mengetahui efek teh hijau terhadap kadar NO pada individu terpapar Pb pembawa polimorfisme dan non polimorfisme gena NOS3. 2) mengetahui efek teh hijau terhadap tekanan darah sistolik dan diastolik pada individu terpapar Pb pembawa polimorfisme dan non polimorfisme gena NOS3. Penelitian menggunakan metode survai dengan rancangan kasus kontrol. 30 orang pekerja bengkel mobil di Purwokerto sebagai subyek kasus dan 30 orang subyek kontrol berasal dari desa Pamijen, yang diperkirakan tidak terpolusi Pb. Untuk mengetahui adanya polimorfisme, gena individu ditentukan dengan metode PCR-RFLP. Enzim restriksi Mbol untuk gena NOS3. Parameter yang diukur adalah kadar Pb darah, NO, tekanan darah sistolik dan diastolik. Data dianalisis dengan uji t berpasangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 40% dari 30 orang subyek kasus terdeteksi sebagai individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dengan genotip GA dan DNA terpotong enzim Mbol sepanjang 206 bp, 119 bp dan 87 bp. Sebanyak 60 % subyek kasus terdeteksi sebagai individu non polimorfisme dengan genotip GG, DNA terletak pada 206 bp. Kadar NO setelah pemberian teh hijau mengalami peningkatan baik pada individu pembawa polimorfisme gena NO3 maupun non polimorfisme, sedangkan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kedua kelompok individu mengalami penurunan. Kesimpulan hasil penelitian teh hijau dapat digunakan sebagai kelator alami keracunan Pb.

**Kata kunci** : Plumbum, nitrit oksida, tekanan sistolik dan diastolik.

### Pendahuluan

Senyawa Plumbum (Pb) banyak digunakan sebagai bahan aditif pada bahan bakar bensin terutama dalam bentuk *tetraethyl lead* (TEL) Kasus pencemaran Pb terbesar terjadi di udara yaitu sekitar 70%, akibat pemakaian TEL pada bahan bakar. Pada saat pembakaran bensin, Pb akan keluar dalam bentuk Pb trietil

berupa partikel yang sangat halus berukuran antara 0,08-1µm. Sebagian Pb tersebut tetap berada di udara dan sebagian lagi akan jatuh ke permukaan bumi kemudian mengendap. Masa tinggal Pb di udara sangat lama sampai 4-40 hari sehingga oleh adanya angin, maka Pb dapat disebarluaskan hingga mencapai jarak 100-1.000

km dari sumbernya (Wani *et al.*, 2015; Assi *et al.*, 2016; Samsuar *et al.*, 2017).

Pencemaran Pb terutama terjadi di beberapa kota di Indonesia seperti Jakarta, Surabaya, Bandung dan Jogjakarta. Hal ini seiring dengan bertambahnya jumlah kendaraan bermotor yang setiap tahunnya meningkat bahkan lebih dari 20 juta unit per tahun. Peningkatan kadar Pb di beberapa kota besar rata-rata mencapai 0,1-0,2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  /tahun atau telah melewati nilai ambang batas Pb di udara yaitu sebesar 0,006  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Kadar Pb di udara Jakarta di kawasan terminal bus dan daerah padat lalu lintas mencapai 2-8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Kadar Pb udara di Jogjakarta 0,09-0,12  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Kadar Pb di udara Surabaya 1,55  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  dan di Bandung telah mencapai 2,1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Gunawan, 2014; Romli *et al.*, 2016).

Senyawa Pb dalam bentuk organik terutama TEL, merupakan senyawa toksik yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia. Senyawa ini mudah masuk lewat inhalasi, larut dalam lemak dan mudah terakumulasi dalam jaringan lunak maupun keras (Lange, 2017). Orang yang sehari-hari kontak dengan senyawa Pb antara lain polisi lalu lintas, operator pompa bensin, sopir bus, pedagang asongan dan orang yang bekerja pada industri yang menggunakan Pb. Kadar Pb di udara sebesar 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  dapat menyebabkan darah manusia mengandung Pb sebesar 0,25-0,53 ppm. Selain itu paparan Pb meskipun dalam kadar rendah (<0,05 ppm) dapat menimbulkan hipertensi, jantung koroner dan gagal ginjal (Seviastuti *et al.*, 2016; Leff *et al.*, 2018).

Paparan Pb dalam jangka lama dapat meningkatkan tekanan darah. Hal ini disebabkan Pb trietil merupakan senyawa radikal yang dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas seperti hidroksil dan anion superoksida, sehingga memicu pembentukan peroksidasi lipida dan menghambat aktivitas enzim nitrit oksida sintase pada endotel (eNOS). Enzim ini berfungsi untuk menghasilkan nitrit oksida (NO) yang berperan dalam vasodilatasi pembuluh darah vaskuler. Adanya hambatan eNOS oleh Pb mengakibatkan produksi NO menurun dan peningkatan aktivitas Angiotensin II vaskuler yang berperan dalam vasokonstriksi, sehingga tekanan darah meningkat dan terjadi hipertensi. Penderita hipertensi akibat paparan Pb keadaannya makin parah apabila membawa polimorfisme gen NOS3. Individu pembawa polimorfisme gen NOS3 G894T menunjukkan penurunan ekspresi eNOS sehingga produksi NO makin menurun, mengakibatkan tekanan darah makin naik (Howard *et al.*, 2005; Jan *et al.*, 2015). Kasus hipertensi akibat paparan Pb pada tahun 2002 di Indonesia, dilaporkan sebanyak 62.000 kasus dan 350 kasus berupa penyakit jantung koroner. Jumlah korban jiwa akibat paparan Pb mencapai

340 jiwa/tahun (Riyadina *et al.*, 2002). Keracunan Pb yang ringan berlangsung tanpa gejala dan pengobatan baru dilakukan setelah kadar Pb darah meningkat sampai di atas 0,5 ppm dengan menggunakan dimerkaprol. Pengobatan ini menimbulkan efek samping, seperti peningkatan tekanan darah, sehingga pemakaiannya kurang aman. Untuk mengatasi hal tersebut perlu dicari alternatif pengobatan dari bahan alami yang lebih aman dan efektif. Teh hijau telah diketahui mengandung flavonoid yang dapat mengkelat logam berat. Salah satu flavonoid yang terkandung dalam teh hijau adalah katekin. Sifat katekin antara lain dapat meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase yang berfungsi dalam proses detoksifikasi keracunan zat toksik di samping sebagai kelator Pb (Visnoi *et al.*, 2017; Chai *et al.*, 2018). Catechin juga berfungsi sebagai radikal *scavenger* terhadap radikal NO seperti peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), sehingga menjadi netral. Berdasarkan pada data di atas catechin dalam teh hijau mempunyai potensi untuk menetralkan keracunan Pb.

## Metode Penelitian

Bahan yang digunakan Teh hijau diperoleh dari PTPN XIV Nusantara Kaligua, Paguyangan, Brebes, sampel darah subyek penelitian. Bahan kimia lain yang diperlukan kit NO. Alat yang digunakan tensimeter, Elisa Reader dan AAS.

Metode penelitian menggunakan metode survai dengan rancangan kasus kontrol. Subyek penelitian adalah pekerja bengkel mobil sebagai subyek kasus, yang mewakili individu terpapar Pb, sebanyak 30 orang. Jumlah total pekerja bengkel mobil di Purwokerto, sebanyak 60 orang. Jumlah populasi ini kurang dari 100 orang, sehingga diambil 50 % yaitu sebanyak 30 orang. Kriteria inklusi: laki-laki, usia 25-55 tahun, masa kerja minimal 3 tahun, kategori pre hipertensi dan tidak sedang meminum obat hipertensi dan bersedia menanda tangani *Informed Consent*. Kriteria eksklusi penderita hipertensi grade 1, mengkonsumsi antioksidan dan diet vegetarian memiliki masa kerja kurang dari 3 tahun. Subyek kontrol diambil dari bukan pekerja bengkel dan tinggal di daerah bebas polusi di desa Pamijen, Baturaden.

### 1. Persiapan teh hijau

#### a. Pengeringan teh hijau

Teh hijau setelah dipetik dari perkebunan Kaligua, dikeringkan selama tiga hari di bawah sinar matahari dengan ditaruh di atas nampan dan ditutup kain hitam. Kemudian daun digulung, dikeringkan lagi pada lemari pengering dengan suhu 40°C.

**b. Pembuatan seduhan teh hijau**

Teh hijau kering diambil sebanyak 1 sendok makan (5 g) dan dilarutkan ke dalam 300 mL air mendidih, setelah 5 menit, seduhan teh disaring dan ampas teh dibuang. Seduhan teh hijau diberikan pada pekerja bengkel 2 kali sehari pagi dan sore hari.

**2. Pengambilan darah individu terpapar Pb dan kelompok kontrol**

Setelah menandatangani *Informed consent*, responden diambil darahnya pada bagian vena mediana cubiti dengan venoject plain ukuran 10 mL. Darah sebanyak 7 mL dibagi menjadi 3 bagian yaitu 3 mL untuk isolasi DNA dan diberi EDTA 10 µL, 1 mL untuk pemeriksaan Pb darah, dan 3 mL untuk pemeriksaan kadar NO. Selanjutnya darah ditampung pada tabung Ependorf dan disentrifuse dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang berwarna kuning berupa serum dipisahkan untuk pemeriksaan NO.

**3. Pemeriksaan parameter utama:**

**a. Pemeriksaan kadar Pb darah (ACGIH, 2000).**

Diambil sampel darah sebanyak 1 mL dan diletakkan pada gelas arloji. Ditambahkan 2 mL asam pengabuan (25 gram K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam HNO<sub>3</sub> pekat sampai volume 100 mL). Ditambahkan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat. Ditutup dan dipanaskan pada suhu 130°C sampai kering dan berwarna hitam. Sesudah berwarna hitam ditambah 2 mL HNO<sub>3</sub> pekat sampai warna abu-abu berubah jadi putih. Selanjutnya abu dilarutkan dengan HNO<sub>3</sub> dan ditentukan kadar Pb menggunakan alat Atomic Absorption Spectrofotometer (AAS). Pemeriksaan dengan AAS menggunakan panjang gelombang 217,6 nm dan kuat arus 3,5 mA dan menggunakan 4 macam larutan standar Pb mulai dari 2, 5, 19 dan 15 ppm Hasil pembacaan dinyatakan dalam satuan ppm.

**b. Pemeriksaan tekanan darah**

Alat tensimeter digital dipasang kira-kira 2 cm di bawah tangan kiri kemudian dikencangkan. Alat tensimeter dihidupkan dengan menekan tombol on. Setelah 2 menit akan keluar angka yang menunjukkan tekanan sistolik (angka bagian atas) dan tekanan diastolik (angka bagian bawah). Hasil dicatat dalam satuan mmHg.

**c. Isolasi DNA Metode Guanidin (Hingorani et al.,1999).**

Darah EDTA 2 mL, diberi eritrosit lysing buffer 8-12 mL, dikocok ringan bolak-balik. Lalu diletakkan dalam lemari es selama 20 menit. Selanjutnya diputar dengan alat sentrifuse 750 g kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang diberi 100 µL SE bufer, dipindah ke tabung Eppendorf ukuran 1,5 mL, lalu ditambah 100 µL guanidin 700 µL kloroform dan 400 µL NaCl 4 M, dikocok kuat. Disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, lalu bagian atas dari 3 lapisan diambil, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Ditambahkan 1 vol isopropanol, dikocok dan muncul kabut. Disentrifuse 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Tampak pellet kemudian supernatan dibuang, sisa ditiriskan dengan kertas tisu. Ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 µL, kocok kuat dan disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dibuang, sisa diusap dengan kertas tissue dikeringkan selama 15 menit. Ditambahkan TE bufer 100-400 µL dan disimpan pada suhu 4°C.

**d. Pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme G894T gena NOS3**

Amplifikasi gena dengan PCR (Hingorani et al.,1999).

Primer forward : 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3' dan primer reverse : 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3', menghasilkan produk sepanjang 206 bp.

Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 94°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94°C 1 menit, annealing 60°C 1 menit, elongasi 72°C 1 menit dan elongasi akhir 72°C 7 menit. Pemotongan PCR product dengan enzim endonuklease *Mbol*. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dan divisualisasikan dengan etidium bromide dibawah sinar UV. Hasil elektroforesis adalah : GG tidak terpotong, TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, GA menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp.

**e. Pengukurankadar NO Metode Griess (Sunarti, 2007)**

Sebanyak 200 µL buffer uji dipipet ke dalam tiap sumuran. Kemudian dipipet ke dalam sumuran dimulai dari larutan standar NO (konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 µmol/L) kemudian diikuti sampel,

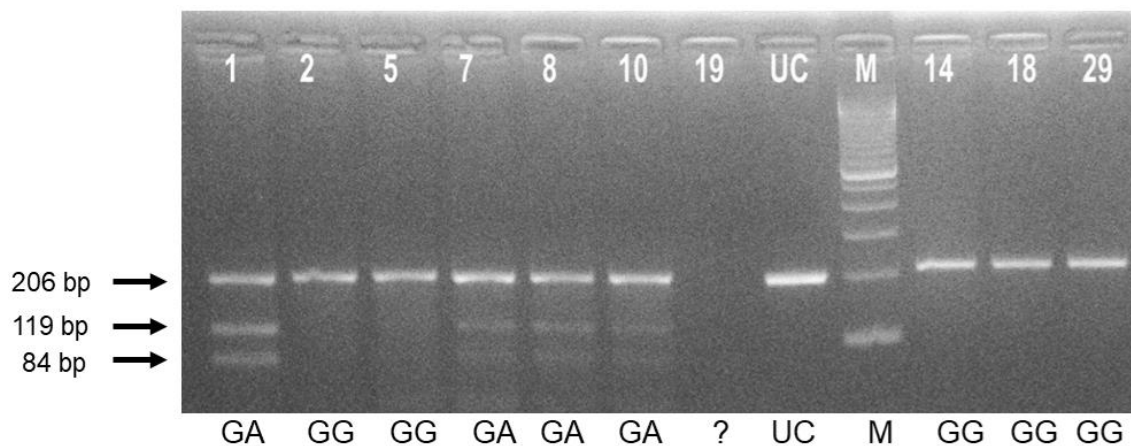
sebanyak 80  $\mu$ L dan masing-masing ditambah 10  $\mu$ L campuran enzim kofaktor dan 10  $\mu$ L campuran nitrat reduktase. *Plate* ditutup dan diinkubasi selama 1-4 jam pada suhu kamar. Tiap sumuran sampel atau standar ditambah 50  $\mu$ L reagen Griess R1 dan 50  $\mu$ L reagen Griess R2. Larutan dibiarkan menjadi berwarna selama 10 menit pada suhu kamar. Larutan dibaca pada 540 nm dengan *plate reader*. Dibuat kurva kalibrasi standar untuk perhitungan kadar NO sampel.

Analisis data untuk polimorfisme gen NOS3 dianalisis secara deskriptif, sedangkan untuk kadar NO, tekanan sistolik dan diastolic sebelum dan sesudah diberi teh hijau menggunakan uji t berpasangan.

## Hasil dan Pembahasan

### 1. Analisis gen yang mengkode eNOS/ Nitrit Oksida Sintase 3 (NOS3)

Hasil analisis gen NOS3 dari 30 orang subyek kasus setelah dilakukan digesti dengan enzim Mbo-1, ditemukan adanya individu pembawa polimorfisme gen NOS3 sebanyak 12 orang, atau sekitar 40% dengan genotip GA. DNA pembawa polimorfisme gen NOS3, terpotong sepanjang 206 bp, 119 bp dan 87 bp, sedangkan 60% dari subyek kasus tidak membawa polimorfisme gen NOS3 atau individu non polimorfisme, dengan genotip GG. DNA non polimorfisme tidak terpotong dan terletak pada 206 bp. Pada subyek kontrol juga tidak ditemukan polimorfisme gen NOS3, produk DNA juga tidak terpotong dan terletak pada 206 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Gen yang mengkode eNOS pada subyek kasus dipotong dengan enzim MboI

Keterangan :

M = Marker

UC = Un Cut (produk DNA tidak dipotong)

GA = genotip individu pembawa plomorfisme gen NOS3

GG = genotip individu non polimorfisme gen NOS3

Enzim nitrit oksida endotel (eNOS) dikode oleh gen NOS3 yang terletak pada kromosom 7q35-36. Adanya polimorfisme gen NOS3 (G894T), menyebabkan penurunan ekspresi eNOS, sehingga produksi NO juga menurun. Beberapa peneliti menemukan bahwa alel yang berhubungan dengan penurunan kadar NO adalah alel Asp. Alel ini juga meningkatkan pemecahan enzim proteolitik terhadap eNOS dan protein, sehingga pada individu pembawa polimorfisme gen NOS3, terjadi penurunan aktivitas eNOS dan memiliki kadar NO lebih rendah dibandingkan individu non polimorfisme (Matsha *et al.*, 2016; Gamil *et al.*, 2017).

Menurut Weaver *et al.* (2006) terdapat juga hubungan antara polimorfisme gen NOS3 dengan kadar Pb pada patella pekerja industri Pb di Korea. Pekerja dengan polimorfisme gen NOS3 memiliki kadar Pb pada patella lebih tinggi yaitu sebesar 10,1 ppm dibandingkan kadar Pb pekerja non polimorfisme yang hanya sebesar 7,5 ppm. Hasil ini memberikan gambaran bahwa adanya polimorfisme gen NOS3 pada individu terpapar Pb, selain menyebabkan penurunan kadar NO juga berhubungan dengan peningkatan kadar Pb pada patella.

## 2. Kadar Plumbum (Pb) darah

Hasil pengukuran kadar Pb pada subyek kontrol maupun subyek kasus yang membawa polimorfisme gena NOS3 maupun individu non polimorfisme dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar Pb pada subyek kontrol dan subyek kasus

Grup	Kadar Pb (ppm)
Polimorfisme <sup>1)</sup>	0,69 ± 0,045 <sup>a</sup>
Non Polimorfisme <sup>2)</sup>	0,39 ± 0,083 <sup>b</sup>
Kontrol <sup>3)</sup>	0,15 ± 0,041 <sup>c</sup>

p= 0, <sup>1)</sup>n = 12; <sup>2)</sup>n = 18; <sup>3)</sup>n = 30. Angka yang diikuti huruf yang tidak sama pada setiap kolom berbeda nyata.

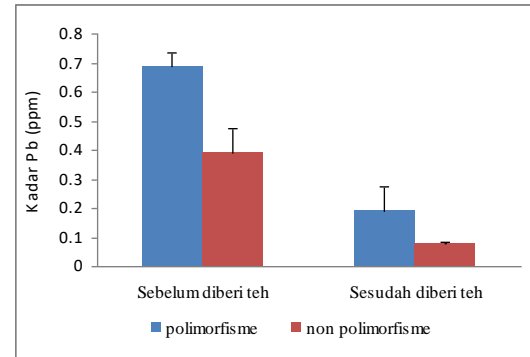
Kadar Pb pada subyek kasus baik pada individu non polimorfisme dan individu pembawa polimorfisme gena NOS3 lebih tinggi dibandingkan subyek kontrol (Tabel 1). Kadar tersebut telah melewati nilai ambang batas Pb darah yaitu > 0,2 ppm. Keracunan Pb yang dialami pekerja bengkel mobil, disebabkan karena mereka setiap hari kontak dengan senyawa Pb baik yang berasal dari asap kendaraan bermotor atau pembakaran bensin yang tidak sempurna, maupun dari pemakaian cat semprot yang mengandung Pb.

Menurut Wahyuningsih (2003) kandungan Pb yang terdapat dalam cat adalah sebagai berikut : *Angelesite* (1%), *Cerussite* (5%), *Fe Pb oxide* (14%), *Fe Pb Sulfat* (3%), *Lead oxide* (4%), *Lead phosphate* (21%), *Mn Pb oxide* (2%), *native lead* (22%) dan *Slag* (4%). Cat semprot banyak digunakan dalam industri mobil dan bengkel mobil. Cat semprot lebih berbahaya daripada kuasnya, karena partikelnya berukuran kecil dan mudah tersebar di udara. Ciri cat semprot adalah mengubah partikel, menjadi bentuk aerosol yang ukurannya lebih kecil, halus, berbentuk cair maupun padat. Hasil survei *Third National Health and Nutrition Examination* survei pada tahun 1994-1998, terhadap tukang cat mobil, ditemukan kadar Pb mereka berkisar antara 0,52-0,70 ppm. Bengkel di wilayah Purwokerto kebanyakan berada di tepi jalan raya sehingga pekerjaannya selain dapat paparan Pb dari dalam bengkel juga mendapat paparan Pb yang berasal dari udara (Hernayanti *et al.*, 2015).

Menurut Wu *et al.* (2016) adanya gena pembawa polimorfisme gen NOS3 menyebabkan ekspresi eNOS berkurang, sedangkan radikal bebas seperti Pb yang masuk tubuh menghambat kerja enzim eNOS (Hernayanti *et al.*, 2012). Hal ini yang menyebabkan individu polimorfisme NOS3 lebih rentan terhadap paparan Pb

dibandingkan individu non polimorfisme, sehingga memiliki kadar Pb lebih tinggi.

Setelah pemberian teh hijau selama 30 hari, terjadi penurunan kadar Pb darah seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kadar Pb (ppm) pada individu polimorfisme dan non polimorfisme sebelum dan sesudah pemberian teh hijau selama 30 hari

Penurunan kadar Pb dalam darah disebabkan karena pemberian teh hijau yang mengandung catechin dapat menetralkan radikal Pb yang masuk tubuh, menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid dan mengaktifkan kembali kerja glutathione peroksidase yang berfungsi mengikat Pb, sehingga terjadi penurunan kadar Pb dalam darah.

## 3. Kadar nitrit oksida (NO)

Kadar NO pada subyek kontrol maupun subyek kasus pembawa polimorfisme gena NOS3 maupun individu non polimorfisme dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar NO pada subyek kontrol dan subyek kasus

Grup	Kadar NO(μmol/L)
Polimorfisme <sup>1)</sup>	5,8 ± 1,29 <sup>a</sup>
Non Polimorfisme <sup>2)</sup>	10,57 ± 1,93 <sup>b</sup>
Kontrol <sup>3)</sup>	18,17 ± 0,77 <sup>c</sup>

p=0,001. <sup>1)</sup>n = 12; <sup>2)</sup>n = 18; <sup>3)</sup>n = 30. Angka yang diikuti huruf yang tidak sama pada setiap kolom berbeda nyata

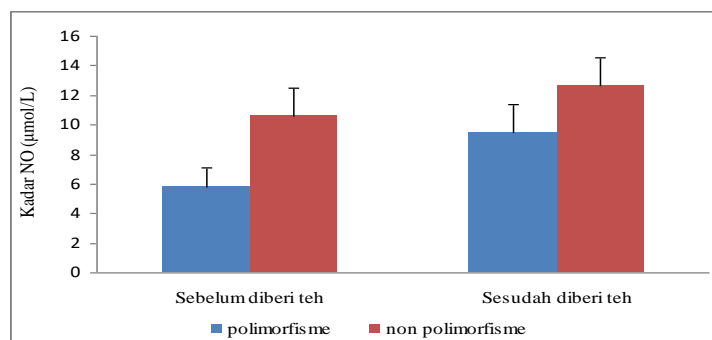
Kadar NO subyek kasus baik pada individu pembawa polimorfisme gena NOS3 maupun individu non polimorfisme lebih tinggi dibandingkan subyek kontrol. Penurunan kadar NO disebabkan karena senyawa Pb yang berasal dari proses pembakaran bensin yang tidak sempurna dari mesin mobil, apabila terhirup pekerja bengkel atau melalui jalur inhalasi akan masuk ke dalam paru-paru. Selanjutnya Pb masuk ke dalam aliran darah dan didarkan ke seluruh tubuh. Senyawa Pb terutama

dalam bentuk Pb trietil.mudah menembus membran sel dan mudah berikatan dengan gugus -SH penyusun enzim. Hal ini menyebabkan terjadinya hambatan terhadap aktivitas enzim penting dalam tubuh.

Salah satu enzim yang bekerjanya dihambat oleh radikal Pb adalah endothelial nitrit oksida sintase (eNOS). Fungsi eNOS adalah menghasilkan nitrit oksida (NO), yang berfungsi sebagai vasodilator dalam regulasi tekanan darah bersama angiotensin II (Ang II) yang berfungsi dalam vasokonstriksi. Adanya hambatan aktivitas eNOS oleh Pb, menyebabkan disfungsi endotel dan terjadi penurunan produksi NO, sehingga kadar NO pada individu terpapar Pb rendah. Penurunan produksi NO menyebabkan aktivasi Ang II lokal pada endotel meningkat sehingga terjadi vasokonstriksi terus menerus dan sebagai akibatnya terjadi peningkatan tekanan darah atau hipertensi (Chu *et al.*, 2017).

Penurunan kadar NO pada subyek kasus non polimorfisme dan pembawa polimorfisme gena NOS3, sesuai dengan pendapat Howard *et al.* (2005) dan Joshi *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa adanya polimorfisme gena NOS3 yaitu gen pengatur eNOS menyebabkan ekspresi eNOS menurun, sehingga produksi NO yang dihasilkan juga sedikit. Hal ini menyebabkan kadar NO pada individu pembawa polimorfisme gena NOS3 yang terpapar Pb sangat rendah, atau lebih rendah dibandingkan dengan individu non polimorfisme terpapar Pb. Hasil analisis statistik kadar NO menggunakan uji t berpasangan pada individu pembawa polimorfisme dan individu non polimorfisme terpapar Pb, juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p=0,001$ ).

Setelah pemberian seduhan teh hijau selama 30 hari terjadi peningkatan kadar NO seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kadar NO (µmol/L) subyek kasus sebelum dan sesudah diberi teh hijau

Teh hijau mengandung catechin yang akan memberikan donor elektron kepada radikal Pb sehingga menjadi netral. Hal ini yang menyebabkan hambatan Pb terhadap enzim eNOS terlepas, sehingga eNOS aktif kembali dan menghasilkan NO sebagai vasodilator. Selain itu catechin juga mengendalikan kerja Angiotensin Converting Enzyme (ACE) yang memproduksi Ang II secara berlebihan seperti akibat paparan Pb, sehingga produksi Ang II menjadi normal seperti semula (Ghafari *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2017; Wanda, 2018). Hal ini yang menyebabkan kadar NO pada subyek kasus meningkat. Peningkatan NO pada individu non polimorfisme dari  $10,57 \pm 1,93$  µmol/l

menjadi  $12,66 \pm 1,85$  µmol/l. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan individu polimorfisme NOS3 yang mengalami peningkatan dari  $5,8 \pm 1,29$  µmol/l menjadi  $9,52 \pm 1,88$  µmol/l. Perbedaan ini disebabkan karena produksi NO yang dihasilkan sejak awal juga berbeda, yaitu pada individu non polimorfisme lebih tinggi dibandingkan individu pembawa polimorfisme gena NOS<sub>3</sub>.

#### 4. Tekanan sistolik dan diastolik

Hasil pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik pada subyek kontrol dan subyek kasus dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Tekanan darah sistolik dan diastolik subyek kasus dan kontrol

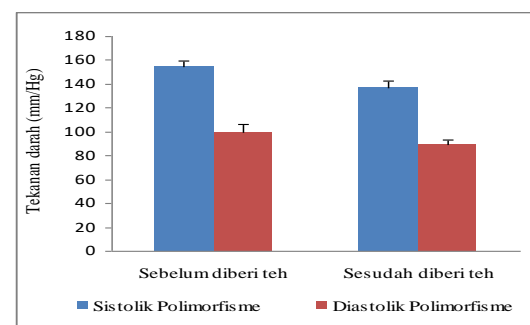
Grup	Tekanan sistolik	Tekanan diastolik
Polimorfisme <sup>1)</sup>	$155,0 \pm 5,3^a$	$100,0 \pm 6,6^a$
Non Polimorfisme <sup>2)</sup>	$133,5 \pm 3,3^b$	$87,5 \pm 4,5^b$
Kontrol <sup>3)</sup>	$120,0 \pm 0,5^c$	$80,0 \pm 0,3^b$

$p = 0,001$ <sup>1)</sup>  $n = 12$ ; <sup>2)</sup>  $n = 18$ ; dan <sup>3)</sup>  $n = 30$ . Angka yang diikuti huruf yang tidak sama pada setiap kolom berbeda nyata.

Subyek kasus baik pembawa polimorfisme gena NOS3 maupun non polimorfisme memiliki tekanan darah lebih tinggi dibandingkan subyek kontrol. Individu dengan tekanan darah sistolik yang melebihi atau sama dengan 140 mm/Hg dan diastolic lebih dari atau sama dengan 90 mm/Hg, didiagnosa menderita hipertensi (JNC, 2007; Amelia *et al.*, 2018). Adapun kategori hipertensi terdiri dari pre hipertensi apabila tekanan sistolik berkisar antara 120-139 mm/Hg dan diastolik 80-89 mm/Hg, hipertensi tingkat 1 tekanan sistolik 140-159 mm/Hg atau diastolik 90-99 mm/Hg. Hipertensi tingkat 2 tekanan sistolik  $\geq 160$  mm/Hg atau diastolik  $\geq 100$  mm/Hg. Berdasarkan kategori tersebut ditemukan individu terpapar Pb yang mengalami pre hipertensi dan hipertensi tingkat 1. Frekuensi hipertensi yang ditemukan dari 30 orang subyek kasus adalah sebanyak 63.7% individu mengalami pre hipertensi dengan tekanan sistolik antara 120-139 mm/Hg dan individu yang mengalami hipertensi tingkat 1 sebesar 37.7%.

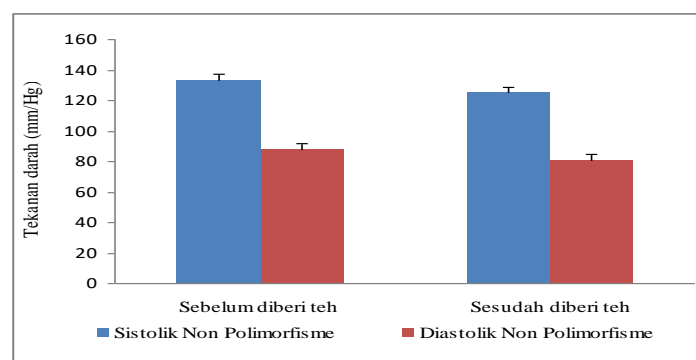
Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat beberapa peneliti yang mengamati hubungan antara kadar Pb dengan prevalensi hipertensi. Menurut Fenga *et al.* (2006), polisi di Boston dengan masa kerja 3 tahun dengan kadar Pb darah sebesar 0,24 ppm, mengalami hipertensi sistolik dan diastolik. Tekanan sistolik sebesar 143 mm/Hg dan diastolik sebesar 94 mm/Hg. Polisi dengan masa kerja 4 tahun, dengan kadar Pb 0,34 ppm mengalami peningkatan sistolik yaitu sebesar 148 mm/Hg, diastolik 96 mm/Hg. Polisi dengan masa kerja 5 tahun darahnya mengandung Pb sebesar 0,41 ppm dan memiliki tekanan sistolik 152 mm/Hg dan diastolik 105 mm/Hg. Pekerja pabrik baterai di Italia dengan masa kerja 5 tahun  $0,42 \pm 0,15$  ppm, juga mengalami kenaikan tekanan darah sistolik dan diastolik rata-rata sebesar  $129,85 \pm 20,99$  mmHg dan diastolik rata-rata  $80,56 \pm 13,33$  mmHg.

Mekanisme timbulnya hipertensi, diawali dengan terjadinya peningkatan radikal bebas dalam tubuh oleh Pb, kemudian hambatan Pb terhadap enzim eNOS pada endotel, sehingga produksi NO menurun, sebaliknya produksi peroksil nitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), meningkat. Hal ini menyebabkan disfungsi endotel. Selain itu  $\text{ONOO}^-$  juga menyebabkan degradasi tetrahidrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) yang merupakan kofaktor eNOS, sehingga terjadi penurunan  $\text{BH}_4$  dan peningkatan dihidrobiopterin ( $\text{BH}_2$ ) serta produksi NO diperpendek, akibatnya vasodilatasi yang diperankan NO juga menurun. Selanjutnya terjadi aktivasi angiotensin II endotel sehingga menyebabkan vasokonstriksi yang berlangsung terus menerus. Peristiwa ini menimbulkan peningkatan tekanan darah atau hipertensi. (Amelia *et al.*, 2018). Setelah pemberian seduhan teh hijau selama 30 hari pada subyek kasus terjadi penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik seperti terlihat pada Gambar 4 dan 5.



Gambar 4. Tekanan sistolik dan diastolik rerata pada individu polimorfisme polimorfisme sebelum dan sesudah diberi teh hijau

Penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik pada individu non polimorfisme lebih besar dibandingkan individu polimorfisme seperti ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Tekanan sistolik dan diastolik rerata pada individu non polimorfisme polimorfisme sebelum dan sesudah diberi teh hijau

Terjadinya penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik disebabkan karena hambatan Pb terhadap eNOS berhasil diredam oleh teh hijau, sehingga eNOS dapat berfungsi kembali untuk memproduksi NO. Selain itu catechin dalam teh hijau juga menghambat aktivitas *angiotensin enzim convertase* yang menghasilkan angiotensin II (Marsha *et al.*, 2016), sebagai akibatnya aktivitas Ang II yang berlebihan dalam vasokonstriksi dapat dikendalikan. Peristiwa

ini yang menyebabkan terjadinya penurunan tekanan darah baik sistolik maupun diastolik.

## Simpulan

Katekin dalam teh hijau berpengaruh terhadap ekspresi gena NOS3, peningkatan kadar NO dan penurunan kadar Pb serta tekanan sistolik dan diastolic pada individu terpapar Pb. Teh hijau dapat berfungsi sebagai kelator alami pada keracunan Pb.

## Daftar Referensi

- Afrasyap. L & G. Osturk.. 2004. NO Synthese Gene Polymorphism (Glu 298 Asp) in the patients with coronary artery disease from Turki Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36 (10):661-666.
- Amelia, L., A. Sukohar & G. Setiawan.2018. Peran Ekspresi Gen Nitrit Oksida Sintase (NOS3) Terhadap Kejadian Hipertensi Esensial. *Majorty*. 7(2): 263-269.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2000. Thresold Limited value and detection method for chemical substances and biological exposure indices, Cincniati.
- Asii, M.A., M.N.M. Hezmee .,A.W. Haron., M.Y.M. Sabri & M.A. Rajion. 2016. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Veterinary World*, 9(6): 660-671.
- Chai, Z.Y., X.M. Li., J.P. Liang., L.P. Xiang., K.R. Wang., Y.L. Shi., R. Yang., M. Shi., J.H. Je., J.L. Lu., X.Q. Zheng & Y.R. Liang. 2018. Bioavailability of Tea Catechins and Its Improvement. *Molecules* 23, 2346.
- Ch. C., J. Deng., Y.Man & Y. Qu, 2017. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *BioMed Research International*. Hindawi: 1-10.
- Fenga, C., A. Cacciola., L.B. Martino., S.R. Calderaro., C.D. Nola., A. Verzera., G. Trimarchi & D. Germano. 2006. Relationship of blood lead levels to blood pressure in exhaust batteray storage workers. *Industrial Health* 44 (11): 304-309.
- Gamil., S., J. Erdmann., I.B. Abdalrahman & A.O. Mohamed. 2017.Association ofNOS3 gene polymorphisms with essential hypertension in Sudanese patients: a case control study *BMC Medical Genetics* 18:128.
- Ghafari, A.B.A., A.M. Shorbaji., L. A.A, Sarori., E.O. Baduwailan., A.A. Basaar., H.A.A. Doghaither., H. F. A. Marzouki., U.M. Omar.2016. Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Green Tea with and without Lemon. *Natural Science*. 8: 247-255.
- Gunawan, G. 2014. Pengaruh Lalu Lintas pada Kandungan Timbal (Pb) Dalam Tubuh Manusia. *Jurnal Transportasi*, 1(1): 47-55.
- Hernayanti, Sukarti, M., Sadewa A.H., Hariono, B., & Wahyuono. S, 2012. Efek Polimorfisme Gena Nitrit Oksida Sintase3 (NOS3) terhadap Kadar Nitrit Oksida dan Tekanan Darah pada Individu Terpapar Plumbum *J.Manusia dan Lingkungan*. 19(2): 160-168.
- Hernayanti. ,Laksana, A.G & S. Aziz. 2015. Efek polimorfisme gena GSTP-1 terhadap aktivitas Glutation S-Transferase (GST) pada individu terpapar logam berat timbal. *J. Manusia dan Lingkungan*.22(3): 305-309.
- Hingorani D.A., C.F.,Liang, J.,Fatibene, A.,Lyon., S.,Monteith., A., Parsons, S., Haydock., R.V., Hooper, N.G., Stephens, K.M Osaughnessy & M.J. Brown 1999. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu 298 → Asp) Is A mayor Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. *Circulation* 10(5):1515-1520. American Health Association, Inc.
- Howard T,D., W.H Giles, J.,Xu, M.A. Woznaik, A.M. Malarcher, L.A.Lange, R.F. Macko, M.J..Basehore,D.A. Meyers,J .W.Cole & S.J.Kittner. 2005 Promoters polymorphisms in the nitrit oxide synthase3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black woman. *Stroke J*. 10 (5): 1848-1853.
- Jan, A.T., M. Azam., K. Siddiqui,A. Ali., I. Choi & Q.M.R. Haq. 2015. *Int. J. Mol. Sci*. 16 : 29592–29630.
- JNC, 2007.The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure U.S. Department of Health and Human Se Rvices National



- Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute. p 11.
- Joshi, M.S., C. Mineo, P.W. Shaul & J.A. Baurer. 2007. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to shear. *The FASEB J.* 21 (9):2655-2663.
- Lange, H & A.V. Condello III.2017. Lead an environment neurotoxic agent. *Journal of Headache & Pain Management.* 2(3):13.
- Leff, T., P. Stemmer., J. Tyrrell & R. Jog, 2018. Diabetes and Exposure to Environmental Lead (Pb). *Toxics* 6(54):1-13.
- Matsha, T.E., C. Pheiffer., T. Mutize., R. T. Erasmus & A. P. Kengne. 2016. Glucose Tolerance, MTHFR C677T and NOS3 G894T Polymorphisms, and Global DNA Methylation in Mixed Ancestry African Individuals. *Journal of Diabetes Research* Hindawi Publishing Corporation.1-8.
- Riyadina, W.M., Notosuwiryo, A.M. Sirait, L. Tana. 2002. Hubungan antara Plumbum (Pb) dalam darah dengan hipertensi pada operator SPBU. *Bul.Penel Kes* 30 (2) : 82-88.
- Romli, M. Suhartono & O.Setiani.2016. Hubungan kadar Plumbum (Pb) dalam darah dengan prestasi belajar pada anak sekolah di SDN Grinting 01 kecamatan Bulakamba kabupaten Brebes. *Jurnal JKLI* 15(2):36-41.
- Samsuar, M. Kanedi., S. Febrice & A.P. Whidalita. 2017. Analisis kadar timbal (Pb) pada rambut pekerja bengkel tambal ban dan ikan mas di sepanjang jalan Soekarno-Hatta Bandar Lampung secara Spektrofotometri Serapan Atom. *Jurnal Kesehatan* VIII 4(1) : 91-97.
- Seviastuti, R., Y.D. Hanani & O. Setiani. 2016. Analisis resiko kesehatan pajanan timbal (Pb) pada pekerja karoseri bus 'X' di kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 4(3): 871-78.
- Sunarti, 2007. Interaksi polimorfisme genetik metilen tetrahidrofolat reduktase dan metabolisme folat pada hipertensi esensial. Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan. Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta p: 51-52.
- Visnoi, H., R.B. Bodia & R. Kant. 2018. Green tea (*Camelia sinensis*) and its antioxidant property: A review. *IJPSR.* 9(5): 1723-36.
- Wahyuningsih., Yunus., Ikhsan & Wijaya. 2003. Dampak inhalasi cat semprot terhadap kesehatan paru. *Cermin Dunia Kedokteran.* 2 : 1-7.
- Wanda C. R. 2018. Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *BioMed Research International.* Hindawi. 1-9.
- Wani, A.L., A. Ara & J.A. Usmani, 2015. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 8(2): 55-64.
- Weaver, V.M., B.K. Lee., A.C. Tood., K.J. Ahn., W. Shi., B.G. Jaar., K.T. Kelsey., M.E. Lustberg., E.K. Silbergeld., P.J. Parsons., J. Wen & B.S. Swarts, 2006. Effect modification by delta aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptors and nitric oxide synthase gene polymorphisms on associations between patella lead and renal function in lead workers. *Environmental Research.* 102: 61-69.
- Wu, Y., Z. Zhu., L. Yin., Y. Liu & A. Li. 2016. The Association between NOS3 Gene Polymorphisms and Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Susceptibility and Symptoms in Chinese Han Population. *BioMed Research International.* Hindawi. 1-8.