



ISSN: 2745-8687

Original Articles

Sanus Medical Journal

DOI 10.22236/sanus.v1i1.6545

Received: February, 2021

Accepted: February, 2021

Published online: February, 2021

# Analisis Kadar Nrf2 Plasma pada Tikus dengan Defisiensi Vitamin B12

Endin Nokik Stujanna<sup>a</sup>, Irena Ujjanti<sup>b</sup>, Ety Farida Mustifah<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departemen Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta, Indonesia

<sup>b</sup>Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta, Indonesia

<sup>c</sup>Departemen Dermatologi dan Venerologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta, Indonesia

## Kata kunci

Nrf2 Plasma, Defisiensi, Vitamin B12

## Abstract

**Background.** Vitamin B12 deficiency is a significant problem, particularly in developing countries. The increasing complexity of the Vitamin B12 molecule, the deficiency condition, causes a complex cell level disorder. The clinical manifestation of vitamin B12 deficiency is anemia, but it is believed that due to the complexity of vitamin B12, there are still other molecular disorders. This study aims to establish the pathway of damage caused by vitamin B12 deficiency in the Nrf2 molecule.

**Methods.** An animal experiment involving 12 male Sprague Dawley rats were randomly divided into control and 16-week treatment. There are two research groups, namely the control group and the treatment group. The control group was given a standard diet, while the treatment group was assigned a vitamin B12 deficiency diet. At the end of treatment, The levels of vitamin B12 in the liver tissue and plasma NRF2 were measured.

**Statistical Analysis:** Nrf2 and vitamin B12 levels were statistically analyzed using the Student's T-test, and the correlation between vitamin B12 and Hb was analyzed using the Spearman test. Data that cannot use by Independent T-test were tested using the Mann Whitney test.

**Results/Conclusion:** There was no significant difference between the control and treatment groups on plasma Nrf2 levels ( $4.02 \pm 0.59$  pg/ml vs  $3.34 \pm 0.55$  pg/ml;  $p = 0.07$ ) and tissue vitamin B12 ( $0.0035 \pm 0.0016$  µg/ml vs  $0.0030 \pm 0.0006$  µg/ml ;  $p = 0.8$ ).

© 2021 SMJ, Jakarta



## Abstrak

Kekurangan vitamin B12 merupakan masalah yang signifikan, terutama di negara berkembang. Peningkatan kompleksitas molekul Vitamin B12, kondisi defisiensi, menyebabkan gangguan tingkat sel yang kompleks. Manifestasi klinis dari defisiensi vitamin B12 adalah anemia, namun diyakini karena kompleksitas vitamin B12 masih terdapat kelainan molekuler lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jalur kerusakan yang disebabkan oleh kekurangan vitamin B12 pada molekul Nrf2.

Hewan percobaan yang melibatkan 12 ekor tikus Sprague Dawley jantan dibagi secara acak menjadi kontrol dan perlakuan 16 minggu. Terdapat dua kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol diberi diet standar, sedangkan kelompok perlakuan diberi diet defisiensi vitamin B12. Pada akhir pengobatan, diukur kadar vitamin B12 di jaringan hati dan NRF2 plasma.

Kadar Nrf2 dan vitamin B12 dianalisis secara statistik menggunakan uji-T Student, dan korelasi antara vitamin B12 dan Hb dianalisis menggunakan uji Spearman. Data yang tidak dapat digunakan dengan Independent T-test diuji menggunakan uji Mann Whitney. Hasil tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan terhadap kadar Nrf2 plasma ( $4,02 \pm 0,59$  pg/ml vs  $3,34 \pm 0,55$  pg/ml;  $p = 0,07$ ) dan vitamin B12 jaringan ( $0,0035 \pm 0,0016$  µg/ml vs  $0,0030 \pm 0,0006$  µg/ml;  $p = 0,8$ ).

## Pendahuluan

Sel secara rutin menghasilkan radikal bebas dan gugus oksigen reaktif (spesies oksigen reaktif/ ROS) yang merupakan bagian dari proses metabolisme. Ketika produksi radikal bebas melebihi antioksidan, stres pada sel dapat terjadi. Kondisi ini dapat disebabkan oleh malnutrisi, meskipun jalur molekuler untuk kondisi ini belum dipelajari secara ekstensif. Salah satu faktor mikronutrien yang jarang diteliti tetapi memiliki pengaruh signifikan terhadap kerusakan sel adalah vitamin B12.<sup>1,2</sup>

Kekurangan vitamin B12 dapat menyebabkan peningkatan kadar homosistein plasma. Selama defisiensi B12, kegagalan biosintesis methionine yang bergantung pada B12 menyebabkan akumulasi Hcy dan dapat mengaktifkan nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase untuk menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS).<sup>3,4</sup> Homosistein adalah asam amino dengan karakteristik toksik ketika terakumulasi dalam sel karena pembentukan gugus sulfhidril, yang menyebabkan produk radikal bebas dan protein salah lipatan.<sup>4</sup> Peningkatan homosistein terkait erat dengan stres oksidatif, yang merupakan ketidakseimbangan antara pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan pertahanan antioksidan. Ketidakseimbangan ini dapat mengakibatkan oksidasi biomolekul sehingga terjadi perubahan struktur

molekul dan fungsi sel.<sup>6</sup> ROS terdiri dari berbagai macam senyawa, antara lain anion superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidrogen. Sejumlah kecil ROS berfungsi secara fisiologis sebagai mekanisme pertahanan patogen. Namun kelebihan ROS akan menyebabkan kerusakan sel melalui interaksi biomolekuler hingga merusak fungsi sel.<sup>7</sup> Reaksi antara radikal bebas dengan membran sel epitel fosfolipid dalam peroksidasi lipid adalah malondialdehid (MDA). Senyawa antioksidan yang berasal dari tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathione peroksidase (GPx) dapat mencegah pembentukan MDA.<sup>8</sup>

Pengurangan antioksidan terutama disebabkan oleh gangguan Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2), faktor transkripsi yang mengatur gen untuk mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi.<sup>9</sup> Stres oksidatif menyebabkan peningkatan regulasi antioksidan endogen dan protein sitoprotektif, dalam kondisi fisiologis untuk mencegah atau membatasi kerusakan jaringan. Proses ini dimediasi oleh Nrf2, yang merangsang transkripsi berbagai gen antioksidan dan enzim detoks. Nrf2 berperan dalam perlindungan terhadap stres oksidatif, antioksidan seluler dan regulasi anti-inflamasi. Aktivasi Nrf2 yang terganggu menghambat induksi gen yang mengkode antioksidan pada hewan percobaan. Dalam kondisi patologis tertentu, produksi Nrf2 dapat berkurang, mengakibatkan berkurangnya enzim yang bertindak sebagai pertahanan tubuh terhadap stres oksidatif. Sehingga tubuh tidak memiliki perlindungan yang cukup terhadap peningkatan produksi radikal bebas.

Peningkatan ROS karena akumulasi homosistein dapat dilihat dari peningkatan produk destruktif ini, salah satunya peningkatan kadar malondialdehid (MDA). Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dialdehid yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid dalam tubuh, konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi atau destruksi membran sel akibat peningkatan produksi ROS. Produksi MDA terutama dicegah oleh antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD). Penelitian difokuskan untuk mempelajari pengaruh kekurangan vitamin B12 pada hewan coba terhadap proses stres oksidatif di jaringan hati melalui penelitian Nrf2.

## Bahan dan Metode

### Perawatan Hewan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan random sampling, menggunakan tikus Sprague Dawley jantan berumur 36-40 minggu, yang diperoleh dari Badan Penelitian dan Kesehatan RI. Besar sampel dihitung dengan metode Federer, sebanyak 12 ekor tikus. Kedua tikus tersebut disimpan di lingkungan dengan suhu terkontrol. Tikus ditempatkan di bawah siklus terang dan gelap 12 jam di kandang isolasi mikro berventilasi, dengan akses ke makanan dan air, dan dipuaskan semalaman sebelum dikorbankan. Hewan uji dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan diberi pakan defisiensi vitamin B12, AIN93M (Diet test, Florida, USA), sedangkan kelompok kontrol diberi pakan standar (RatBio, Bogor, Indonesia) selama

**Tabel 1.** Kadar Vitamin B12 Jaringan dan Nrf2 Plasma

	Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan
Vitamin B12 Jaringan	0,0035 ± 0,0016	0,0030 ± 0,0006
Nrf2 Plasma	4,02 ± 0,59 pg / ml	3,34 ± 0,55 pg / ml

16 minggu untuk setiap kelompok. Setelah perlakuan, plasma dan jaringan hati disimpan dalam freezer pada suhu -80 °C. Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) FKUI RSCM telah menyetujui penelitian ini dengan nomor: 184/UN2.F1/ETIK/2017.

#### Parameter Biokimia

Setelah kondisi puasa, darah diambil dari sinus supraorbital pada waktu yang ditentukan. Hewan coba dilakukan dekapitasi dan organ hati diambil. Hati tikus beku diresuspensi dalam PBS sebelum homogenisasi. Homogenat hati digunakan dalam pengukuran Vitamin B12. Kadar Vitamin B12 plasma ditentukan dengan menggunakan kit standar ELISA (Rat Vitamin B12 ELISA, FineTest, China). Kadar Nrf2 plasma ditentukan dengan menggunakan kit standar ELISA (Rat Nrf2 ELISA, FineTest, China).

#### Analisis Statistik

Hasil dinyatakan sebagai mean norm error (SEM). Perbedaan statistik dihitung menggunakan uji-t Student. Signifikansi statistik telah ditunjukkan sebagai \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

#### Hasil dan Diskusi

Model eksperimental yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Sprague Dawley yang diberikan diet restriksi vitamin B12, diet defisiensi AIN93M (Diet test, Florida, USA), dan pakan standar sebagai pakan pada kelompok kontrol (RatBio, Bogor, Indonesia). Pemilihan pakan AIN93M ini dikarenakan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ghosh et al., Amani et al., Dan Santoso et al., Yang menunjukkan bahwa pakan AIN93M menunjukkan penurunan kadar vitamin B12 dan peningkatan kadar homosistein. Dalam plasma dan jaringan hati, yang juga dapat menyebabkan kerusakan struktural, dan fungsi ginjal, jantung, dan hati.<sup>3,10,11</sup>

Setelah 16 minggu pemberian diet, kadar vitamin B12 dinilai dalam jaringan hati. Pada penelitian ini pengukuran kadar vitamin B12 jaringan hati pada kelompok kontrol adalah 0,0035 ± 0,0016 µg / ml, sedangkan pada kelompok perlakuan sebesar 0,0030 ± 0,0006 µg/ml, dengan signifikansi p = 0,8). Meskipun tidak terdapat perbedaan yang signifikan, namun terjadi penurunan kadar vitamin B12 pada jaringan hati antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini sesuai studi yang dilakukan oleh Sianipar et al. dan Santoso et al., dimana AIN93 dietary feed-in mencit Sprague Dawley menunjukkan penurunan kadar vitamin B12 di jaringan hati.<sup>12</sup> Salah satu faktor penyebab tidak ada perbedaan signifikan terlihat karena durasi penelitian yang singkat, disebabkan penyimpanan vitamin B12 terdapat di jaringan hati, sehingga waktu

pemberian diet yang kurang lama mengakibatkan belum terdeteksinya pengurangan yang bermakna pada jaringan hati.<sup>13</sup> Hasil analisis statistik penghitungan plasma Nrf2 menggunakan uji-T independen. Kelompok kontrol memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan. Nilai kelompok kontrol adalah 4.02 ± 0.59 pg/ml sedangkan nilai kelompok perlakuan adalah 3.34 ± 0.55 pg/ml. Terjadi penurunan kadar plasma Nrf2 antara kelompok kontrol dan perlakuan, walau tidak didapatkan nilai yang signifikan Nrf2 merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam mempertahankan homeostasis redoks seluler dengan mengatur ekspresi protein sitoprotektif.<sup>9</sup> Pada penelitian yang dilakukan oleh Sireesh et.al secara in vitro dan in vivo, telah di buktikan bahwa aktivasi Nrf2 melemahkan toksisitas sitokin oksidatif dan pro-inflamasi selama hiperglikemia melalui kaskade pensinyalan Nrf2.<sup>14</sup>

Pada penelitian ini, peningkatan produksi ROS menghasilkan penurunan kadar Nrf2 plasma karena proses homosisteinilasi disebabkan oleh peningkatan hasil homosistein di plasma yang menyebabkan kerusakan pada protein Nrf2 secara struktur.<sup>15</sup> Hal ini mengikuti hipotesis dalam penelitian ini yang menyatakan bahwa kekurangan vitamin B12 mengakibatkan peningkatan produksi ROS, yaitu disebabkan oleh peningkatan kadar homosistein dan terganggunya sistem pertahanan antioksidan akibat gangguan ekspresi enzim SOD akibat penurunan kadar NRF2 di hati.<sup>9</sup> Temuan ini didukung oleh beberapa penelitian baik yang dilakukan secara in vivo ataupun in vitro mengenai kondisi defisiensi vitamin B12 yang menyebabkan peningkatan resiko terjadinya stress oksidatif.<sup>2,16,17</sup>

#### Kesimpulan

perbedaan kadar vitamin B12 jaringan hati pada hewan coba yang diberi pakan defisiensi vitamin B12, dimana pada kelompok perlakuan memiliki kadar yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan kadar Nrf2 pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terutama untuk melihat ekspresi dari gen Nrf2 dan kadar plasma vitamin B12.

#### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada seluruh staf pendukung di Fakultas Kedokteran dan terima kasih kepada Lemlit UHAMKA.

## Referensi

- Pooya S, Blaise S, Garcia MM, Giudicelli J, Alberto J, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 $\alpha$  hypomethylation and decreased ER- $\alpha$ , ERR- $\alpha$ , and HNF-4 $\alpha$  in the rat liver. *J Hepatol* [Internet]. 2012;57(2):344–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.028>
- Bito T, Misaki T, Yabuta Y, Ishikawa T, Kawano T, Watanabe F. Vitamin B12 deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol* [Internet]. 2017;11(October 2016):21–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.013>
- Ghosh S, Sinha JK, Putcha UK, Raghunath M. Severe but Not Moderate Vitamin B12 Deficiency Impairs Lipid Profile, Induces Adiposity, and Leads to Adverse Gestational Outcome in Female C57BL/6 Mice. *Front Nutr* [Internet]. 2016;3(January):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2016.00001>
- Siow YL, Au-yeung KKW, Woo CWH, Karmin O. Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> subunits in monocytes via protein kinase C $\beta$  activation. 2006;82:73–82.
- Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab*. 2017;14(1):1–12.
- Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*. 2014;5 JUL(August):1–15.
- Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil*. 2013;14(4):158–72.
- Sutti S, Jindal A, Locatelli I, Vacchiano M, Gigliotti L, Bozzola C, et al. Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology*. 2014;59(3):886–97.
- Zheng F, Gonçalves FM, Abiko Y, Li H, Kumagai Y, Aschner M. Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. *Redox Biol* [Internet]. 2020;34(February):101475. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475>
- Amani P, Prijanti AR, Jusuf AA, Kartinah NT, Ujjanti I, Murthi AK, et al. Cobalamin restriction with AIN-93M chow modification: Hematology and cardiovascular parameter assessment. In: *AIP Conference Proceedings*. 2019.
- Santoso DIS, Murthi AK, Yolanda S, Amani P, Ujjanti I, Sianipar IR. The impact of cobalamin deficiency on heart function: A study on abnormalities in electrocardiography patterns. *Int J Appl Pharm*. 2019;11(Special Issue 6).
- Sianipar IR, Ujjanti I, Yolanda S, Yusuf AA, Kartinah NT, Amani P, et al. Low vitamin B12 diet increases liver homocysteine levels and leads to liver steatosis in rats. 2019;38(3):194–201.
- Sugihara T, Koda M, Okamoto T, Miyoshi K, Matono T, Oyama K. Falsely Elevated Serum Vitamin B 12 Levels Were Associated with the Severity and Prognosis of Chronic Viral Liver Disease. 2017;31–9.
- Sireesh D, Dhamodh U, Ezhilarasi K, Vijay V. Association of NF-E2 Related Factor 2 ( Nrf2 ) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. 2018;(March):2–11.
- Jakubowski H, Głowacki R. CHEMICAL BIOLOGY OF HOMOCYSTEINE THIOLACTONE AND RELATED METABOLITES Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Department of Biochemistry and Biotechnology, Life Sciences Hcy- Protein N- linked Hcy tHcy. 2011;55:81–103.
- Solomon LR. Functional cobalamin ( vitamin B12 ) deficiency : role of advanced age and disorders associated with increased oxidative stress. *Eur J Clin Nutr*. 2015;(January):687–92.
- van de Lagemaat EE, de Groot LCPGM, van den Heuvel EGHM. Vitamin B 12 in relation to oxidative stress: A systematic review. *Nutrients*. 2019;11(2).