



## Peran Gen Polimorfik $\delta$ Asam Amino Levulinat Dehidratase pada Intoksikasi Pb

Henna Rya Sunoko\*

### ABSTRACT

*The role of  $\delta$  amino levulinic acid dehydratase polymorphism gene in lead intoxication.*

**Background:** Three distinct isozymes, designated ALAD 1-1, 1-2, and 2-2 are resulted from the expression of two common alleles, designated ALAD<sup>1</sup> and ALAD<sup>2</sup>. The existence of this polymorphism gene whose product was implicated in the pathogenesis of lead toxicity suggested the potential for a genetically determined differential susceptibility. This study was attempted to investigate the role of ALAD polymorphism gene in lead intoxication showed by children blood lead levels.

**Methods:** The study involved 54 children with 5-10-year-old, coming from Gebang Sari, Sekaran and Moro Demak. Cross-sectional design was adopted in this research. Blood lead level was measured by atomic absorption spectrophotometer. The ALAD polymorphism in exon 4 was determined by polymerase chain reaction (PCR) with restriction fragment length polymorphism, according to the methods described by Schwartz et al. Data were not statistically analyzed due to only two samples were ALAD<sup>2</sup>.

**Results:** Two samples were ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozymes) with blood lead levels (BLL) of 24.50 ppb and 91.70 ppb respectively. The mean of ALAD<sup>2</sup> BLL was about 48.60 ppb higher compared to that of ALAD<sup>1</sup> BLL.

**Conclusion:** Individuals with ALAD<sup>2</sup> genotype had blood lead levels higher than those of individuals with the ALAD<sup>1</sup> genotype, therefore, ALAD<sup>2</sup> genotype was much more susceptible to lead.

**Key Words:** ALAD polymorphism gene, ALAD<sup>1</sup>, ALAD<sup>2</sup>, blood lead level

### ABSTRAK

**Latar belakang:** ALAD 1-1, 1-2, dan 2-2, adalah tiga isozym yang berasal dari dua macam alel yaitu ALAD<sup>1</sup> dan ALAD<sup>2</sup>. Keberadaan gen ALAD polimorfik dengan produknya ini, dalam patogenesis toksisitas Pb telah mengimplikasikan bahwa secara genetik sangat potensial untuk menyebabkan terjadinya perbedaan suseptabilitas terhadap Pb. Penelitian ini ditujukan untuk mempelajari peran gen ALAD polimorfik pada intoksikasi Pb yang ditunjukkan oleh tingkat kadar Pb darah.

**Metode:** Penelitian mengikutsertakan 54 anak, umur 5-10 tahun, berasal dari Gebang Sari, Sekaran dan Moro Demak. Penelitian didesain secara cross-sectional. Kadar Pb darah diukur dengan alat atomic absorption spectrophotometer. ALAD polimorfik pada exon 4 dideterminasi dengan polymerase chain reaction (PCR) dengan restriksi "fragment length polymorphism" sesuai dengan metoda Schwartz et al. Analisis statistik tidak dilakukan sebab hanya ada dua sampel dengan ALAD<sup>2</sup>.

**Hasil:** Ditemukan dua sampel anak dengan ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozymes), kadar Pb darah masing-masing 24,50 ppb dan 91,70 ppb. Rerata kadar Pb darah dengan ALAD<sup>2</sup> lebih tinggi sekitar 48,60 ppb dibanding rerata kadar Pb darah dengan ALAD<sup>1</sup>.

**Simpulan:** Genotipe ALAD<sup>2</sup> lebih suseptibel terhadap Pb.

## PENDAHULUAN

Pemajanan kronik Pb dalam dosis kelumit dapat menyebabkan gangguan pada berbagai aktivitas enzim dan mempengaruhi berbagai sistem organ.<sup>1-4</sup> Dari berbagai hasil penelitian diketahui bahwa terdapat hubungan logaritmik antara konsentrasi Pb dalam darah dengan gangguan sistem organ.

Hal ini disebabkan karena sifat Pb yang lipofilik, dengan demikian Pb dapat menembus membran sel, berikatan dengan protein yang kemudian akan merubah struktur tertier dari protein tersebut dan menginaktifkan properti enzimatik sehingga mengganggu metabolisme selular.<sup>2-3,5</sup>

Selain sifat Pb yang lipofilik, sifat lain yang merugikan adalah afinitasnya yang demikian kuat terhadap gugus sulfhidril dari sistein, gugus amino dari lisin, gugus karboksil dari asam aspartat dan glutamat, serta gugus hidroksil dari tirosin. Karena sifat Pb yang dapat berikatan dan memodifikasi struktur tertier protein dan menginaktifkan properti enzimatik tersebut, terutama enzim-enzim yang kaya akan gugus -SH, telah menyimpulkan bahwa setiap atom Pb dapat menginduksi kerusakan biokimia tubuh.<sup>1,3-7</sup> Efek dominan atau efek pertama yang terjadi akibat afinitas Pb terhadap gugus sulfhidril, terjadi pada properti enzimatik yang berperan pada biosintesis heme, antara lain enzim  $\delta$  asam amino levulinat dehidratase (ALAD), enzim coproporfirin oksigenase dan enzim ferokhelatase.<sup>1-4,6</sup> Adanya hambatan pada biosintesis heme dapat terjadi pada dosis Pb yang sangat rendah. Apabila gangguan berlanjut akan terjadi efek neurologik dan efek-efek lainnya pada target organ termasuk anemi yang ditandai oleh hipokhromik monositik disertai dengan penurunan rerata korpuskular hemoglobin dan *stippling* pada eritrosit dan retikulosit. Oleh sebab itu dikatakan bahwa gangguan yang terjadi pada fungsi saraf dimediasi oleh gangguan pada sintesis heme.<sup>7-8</sup> Dengan demikian untuk efek subklinis pada pajanan Pb, gangguan pada biosintesis heme adalah dominan.

Akhir-akhir ini perhatian terhadap pajanan Pb telah banyak difokuskan pada pemahaman atas faktor genetik dan hubungannya dengan pajanan zat tersebut. Hal ini disebabkan karena terdapatnya evidensi pada individual yang mengalami pajanan Pb lingkungan yang sama, karena adanya pengaruh faktor genetik tertentu telah memberikan simtom yang berbeda. Sebagai contoh, studi epidemiologi yang dilakukan terhadap sekelompok komunitas yang mengalami pajanan Pb lingkungan yang sama, ternyata menyebabkan variasi efek gangguan fungsi ginjal dan perbedaan kadar ekskresi asam urat yang berasosiasi dengan gen ALAD.<sup>8</sup> Perbedaan efek

terhadap fungsi ginjal dan urikemia juga ditemukan pada penelitian mengenai efek pajanan Pb di tempat kerja yang dilakukan pada 691 anggota *Construction Union* dan 89 pekerja tambang timah, dan disimpulkan adanya variasi tersebut berasosiasi dengan gen ALAD.<sup>13-14</sup> Identifikasi akan adanya faktor genetik tertentu diharapkan dapat menerangkan hubungan antara gen tersebut dengan variasi simtom yang terjadi pada pemajanan Pb.

Salah satu gen polimorfik yang diasumsikan dapat memodifikasi distribusi farmakokinetik dari Pb berikut toksokinetiknya adalah gen dengan alel yang mengkode produksi enzim  $\delta$  asam amino levulinat dehidratase (ALAD), yang merupakan enzim ke dua pada alur biosintesis heme.<sup>10-11</sup> Adanya polimorfik pada protein enzim ALAD manusia telah dibuktikan dalam penelitian Battistuzzi *et al* pada tahun 1981.<sup>11</sup> Penelitian kemudian dilanjutkan oleh Wetmur *et al* yang sepuluh tahun kemudian setelah penelitian Battistuzzi *et al*, menemukan penyebab polimorfisme pada protein enzim ALAD adalah karena adanya *transversion* dari G-ke-C pada nukleotida yang ada dalam region codon 59 sehingga menyebabkan terjadinya substitusi asam amino lisin oleh asparagin.<sup>12</sup> Adanya substitusi ini akan menyebabkan terjadinya perbedaan afinitas Pb terhadap gen polimorfik tersebut.<sup>12</sup> Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui peran gen ALAD polimorfik pada intoksikasi Pb yang ditunjukkan oleh kadar Pb darah anak.

## METODE

### Sampel penelitian

Penelitian dirancang secara *cross-sectional*, yaitu penelitian non-eksperimental dengan model pendekatan *point time*. Sampel penelitian adalah anak sebanyak 54 orang, yang memenuhi kriteria inklusi: usia 5-10 tahun, telah tinggal di daerah penelitian selama 3 tahun terakhir, dan tidak menderita porfiriasis. Kriteria eksklusi: usia <5 tahun atau >10 tahun, lama tinggal <3 tahun dan menderita porfiriasis. Pengambilan sampel dilakukan secara *cluster*, yaitu 23 sampel anak diambil dari Kelurahan Gebang Sari Kecamatan Genuk Kota Semarang, 17 sampel anak dari Kelurahan Sekaran Kecamatan Gunung Pati Kota Semarang, dan 14 sampel anak berasal dari Desa Moro Demak Kecamatan Bonang Kabupaten Demak. Gebang Sari mewakili lokasi dengan cemaran Pb tertinggi di Kota Semarang, Sekaran mewakili daerah dengan cemaran Pb terendah di Kota Semarang, dan Moro Demak mewakili daerah pantai dengan kadar cemaran Pb antara Gebang Sari dan Sekaran.

### Teknik pengumpulan data

Tipe spesimen: darah vena (EDTA *whole blood*) untuk mengukur kadar Pb darah, Pb darah diukur dengan AAS, serta darah vena tanpa EDTA digunakan untuk ALAD *genotyping*, terhadap darah tanpa EDTA, dilakukan lisis, presipitasi protein, kemudian presipitasi DNA. DNA yang dihasilkan kemudian dianalisis gen ALADnya (genotipe ALAD pada exon 4). Analisis genotipe ALAD pada exon 4: ALAD polimorfik pada exon 4 ditentukan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan *restriction fragment length polymorphism*, sesuai dengan metoda Schwartz *et al.*<sup>15</sup> Yaitu: 1). ALAD *genotyping*: 1  $\mu$ l DNA sampel setara dengan 100ng ditambah premix *platinum taq polymerase* sebanyak 17 $\mu$ l dan campuran primer *forward* dan *reverse* sebanyak 2 $\mu$ l (20 pmol/ $\mu$ l). Profil PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut: *initial denaturation* pada temperatur 95<sup>o</sup>C selama 5', *extension* sebanyak 30 *cycles* pada temperatur 95<sup>o</sup> C selama 30'', 55<sup>o</sup>C selama 30'' dan 72<sup>o</sup>C selama 30'', dilanjutkan dengan *polishing step* pada temperatur 72<sup>o</sup>C selama 5' dan 26<sup>o</sup>C selama 10''. Primer yang digunakan adalah 3' dan 5' *oligonucleotide* (5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' dan 5'-GGCAAAGAACAGGTCCATTC-3') yang menghasilkan fragment sebanyak 916 bp. Hasil amplifikasi fragment dipotong pada tempat MSP1 yang dilakukan dengan cara: 10 $\mu$ l hasil produk PCR ditambah 1 $\mu$ l MSP1 kemudian diinkubasi pada temperatur 37<sup>o</sup>C selama minimal 4 jam. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan elektroforesis dengan cara dilarikan melalui standar 6% polyacrylamide gel (2 x TAE, 19: acryl:Bis) pada 300 V selama 45'. Hasil elektroforesis kemudian dideteksi dengan pewarnaan *silver stain*. 2). ALAD *silver staining*: Gel hasil elektroforesis ditempatkan dalam wadah yang berisi larutan etanol 10% selama 10', taruh wadah tersebut dalam goyangan selama satu malam. Etanol kemudian dituang ke tempat lain (larutan ini masih dapat digunakan, jadi jangan dibuang). Kemudian tuangkan 200 ml air *milli-Q* ke dalam wadah yang berisi gel tadi, dan tambahkanlah 2 ml HNO<sub>3</sub> *conc*, dan didiamkan selama 3', lalu buang larutannya. Cuci gel secara cepat dengan air *milli-Q*, kemudian tambahkan 400 ml larutan AgNO<sub>3</sub> 10M, diamkan selama 20'. Tuangkan larutan AgNO<sub>3</sub> tersebut ke dalam wadah lain (jangan dibuang, larutan ini dapat digunakan untuk 20-30 x pemakaian). Cuci gel secara cepat dalam 200 ml 0,5% formaldehyd (V/V dalam air *milli-Q*). Air cucian kemudian dibuang. Setelah itu buat larutan 0,1 M NaOH/ 0,01% larutan formaldehyd. Develop gel dengan cara direndam dalam 1/3 bagian dari larutan ini. Larutan kemudian dibuang dan tuangkan sisa larutan (sisa 2/3 bagian tadi), develop

dilakukan kembali sampai diperoleh gambar ALAD alel dalam gel (biasanya sekitar 1-5'). Tuangkan larutan developer dan cuci gel dalam % asam asetat glacial selama 10', cuci dengan etanol 10% (pakai etanol yang telah digunakan pada langkah pertama di atas) selama 5'. Keringkan gel untuk digunakan sebagai permanen rekord, dengan menggunakan *Promega gel drying frames* dan *Promega gel drying film*.

Dalam penelitian ini analisis statistik tidak dapat dilakukan, karena hanya ada dua sampel darah dengan alel yang berbeda.

### HASIL

Dalam penelitian ini digunakan sampel anak dengan umur 5–10 tahun, serta telah berdomisili di daerah penelitian selama minimal 3 tahun. Sampel anak dipilih karena suseptabilitasnya terhadap pemajanan Pb lingkungan, serta mobilitasnya yang relatif rendah dibanding orang dewasa. Diharapkan dengan menggunakan kriteria tersebut waktu yang dibutuhkan oleh Pb untuk memajan pada anak telah cukup. Rentang waktu pemajanan minimal 3 tahun digunakan dalam penelitian, karena Pb ambien memajan secara kronik pada dosis kelumit, sehingga diperlukan waktu yang cukup lama untuk berakumulasi dalam tubuh. Dengan demikian diasumsikan bahwa Pb yang terakumulasi dalam tubuh anak sebagian besar adalah Pb ambien yang terdapat di daerah penelitian. Sebaran sampel terdiri atas 23 anak dari Gebang Sari, 17 anak dari Sekaran dan 14 anak dari Moro Demak. Jenis kelamin seluruh sampel anak baik laki-laki maupun perempuan jumlahnya sama yaitu 27 laki-laki dan 27 perempuan. Rerata umur seluruh sampel anak 7,91 $\pm$ 1,39 tahun.

### Kadar Pb Darah Sampel Anak

Pb yang diukur dari darah anak adalah Pb yang terkandung dalam *whole blood*. Kadar rerata Pb untuk seluruh sampel anak adalah 13,078 $\pm$ 12,300 ppb (tabel 1). Dari data terlihat bahwa 46,3% di antaranya mengandung Pb dengan kadar  $\leq$ 10 ppb, dan sisanya sebanyak 53,7% mempunyai kadar Pb di atas 10 ppb. Kadar Pb darah anak di Gebang Sari berkisar dari kadar terendah 1 ppb sampai tertinggi 21 ppb, Sekaran antara 6,80 ppb–14,40 ppb, dan Moro Demak antara 9,20 ppb–91,70 ppb. Dengan demikian kisaran kadar Pb untuk seluruh sampel berada pada kadar antara 1 ppb–91,70 ppb.

### ALAD Alel

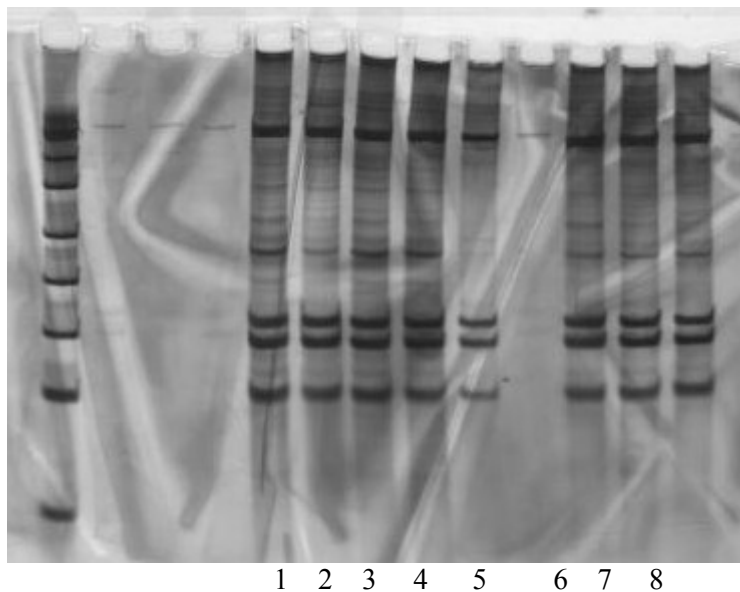
ALAD *genotyping* yang dilakukan sesuai dengan protokol untuk PCR memberikan hasil seperti yang tertera pada gambar 1-5. Hasil *genotyping* menunjukkan bahwa terdapat dua sampel yaitu sampel nomor 36 dan

sampel nomor 43 merupakan gen heterozygot ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozyme), sedangkan 52 sampel lainnya merupakan gen ALAD<sup>1</sup> (1-1 isozyme), dan tidak ada sampel yang memiliki ALAD<sup>2</sup> dengan 2-2 isozyme. Penelusuran lebih lanjut menunjukkan bahwa gen ALAD<sup>2</sup> tersebut dimiliki oleh sampel anak dengan kadar Pb 24,50 ppb dan 91,70 ppb, dan kedua anak tersebut tinggal di Moro Demak. Kadar tersebut merupakan kadar Pb tertinggi

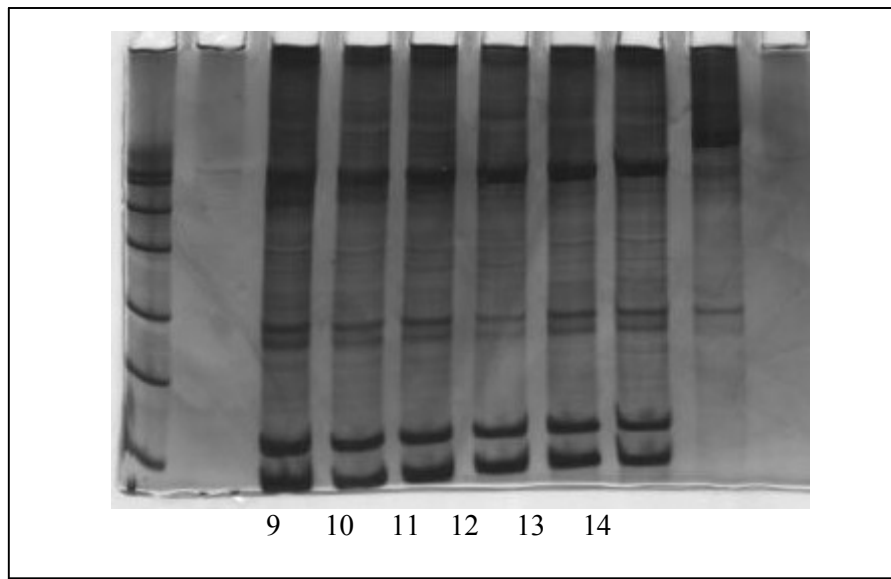
yang ditemukan pada data sampel penelitian. Karena hanya terdapat dua sampel dengan gen ALAD<sup>2</sup> maka tidak dapat dilakukan analisis statistik lebih lanjut. Namun demikian, tingginya kandungan Pb dalam darah anak yang memiliki gen tersebut telah menunjukkan bahwa polipeptida gen ALAD<sup>2</sup> mempunyai ikatan dengan Pb yang lebih tinggi bila dibanding dengan gen ALAD<sup>1</sup>.

Tabel 1. Rerata Kadar Pb Dalam Darah Anak di Lokasi Penelitian

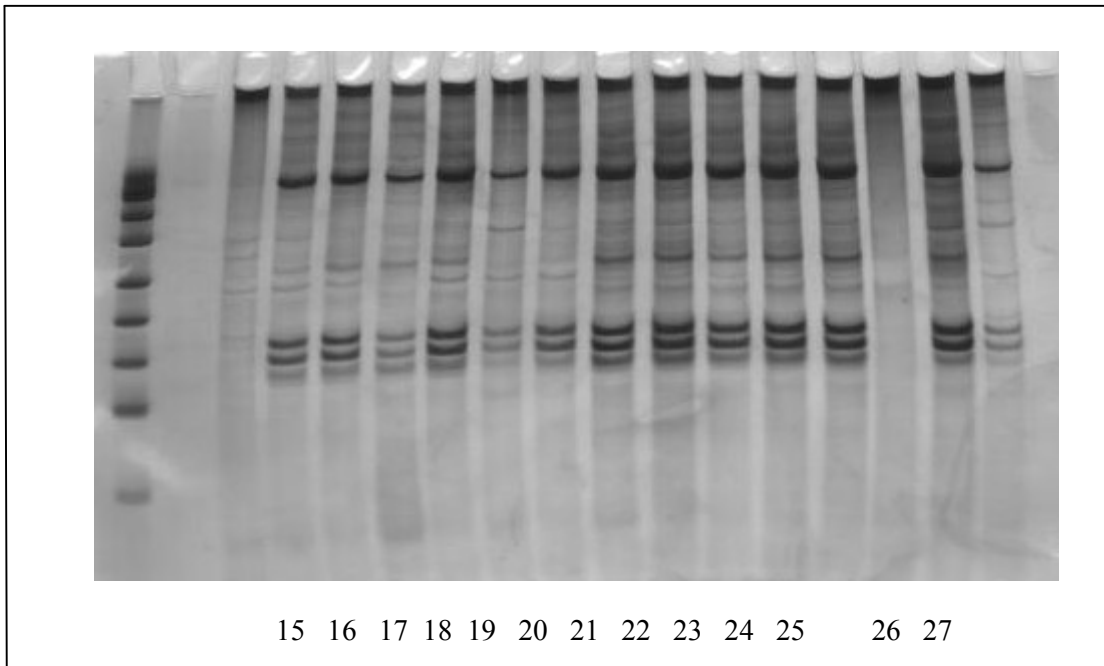
Lokasi	Rerata (ppb)	N	Std. Deviasi
Gebang Sari	9,478	23	6,875
Sekaran	10,512	17	2,504
Moro Demak	21,25	14	20,901
Seluruh lokasi	13,079	54	12,300



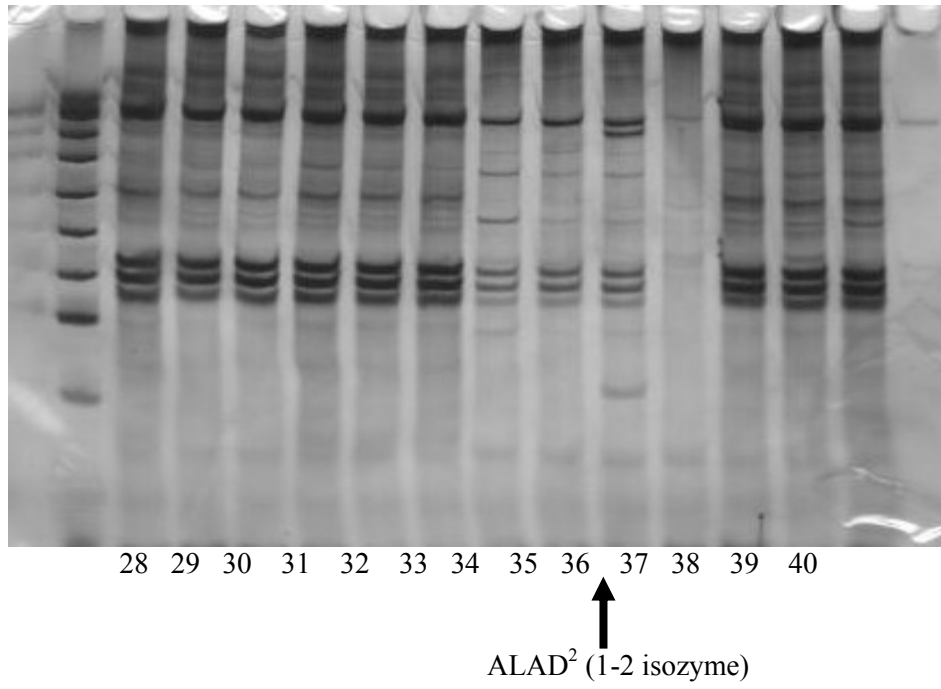
Gambar 1. ALAD *genotyping* sampel darah anak 1-8



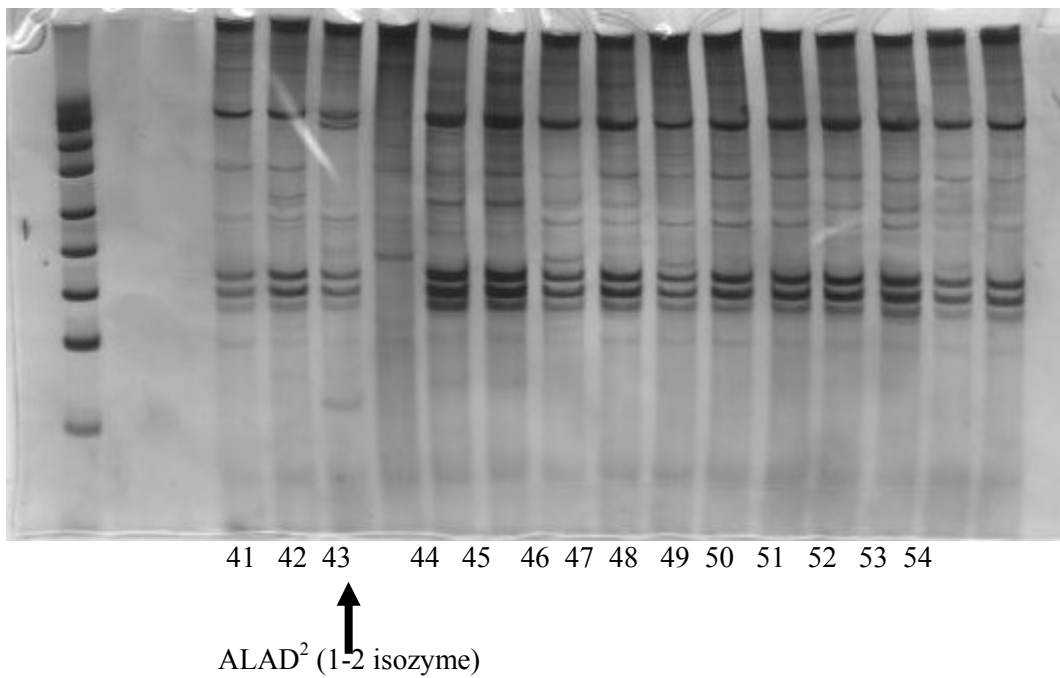
Gambar 2. ALAD *genotyping* sampel darah anak 9-14



Gambar 3. ALAD *genotyping* sampel darah anak 15-27



Gambar 4. ALAD *genotyping* sampel darah anak 28-40



Gambar 5. ALAD *genotyping* sampel darah anak 41-54

## PEMBAHASAN

Delta-Asam Amino Levulinat Dehidratase atau lebih dikenal sebagai ALAD (porfobilinogen sintase, EC 4.2.1.24), merupakan enzim kedua yang terdapat dalam biosintesis heme. Gen ALAD pada manusia yang terletak pada khromosom 9q34, mempunyai dua alel yaitu ALAD<sup>1</sup> dan ALAD<sup>2</sup>, ALAD<sup>2</sup> merupakan polimorfisme dari gen tersebut. Pada anak dan juga dewasa heterozygot ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozyme) maupun homozygot ALAD<sup>2</sup> (2-2 isozyme) rata-rata dapat mengandung Pb 9-11  $\mu\text{g}/\text{dl}$  lebih tinggi bila dibanding dengan ALAD<sup>1</sup> (1-1 isozyme). Kemungkinan perbedaan ini disebabkan karena polipeptida ALAD<sup>2</sup> mempunyai ikatan dengan Pb lebih kuat bila dibanding dengan ALAD<sup>1</sup>.<sup>12</sup>

Penelitian-penelitian yang dilakukan selama lebih dari dua dekade telah menyimpulkan pentingnya peran ALAD, baik dalam patogenesis maupun dalam diagnosis keracunan Pb.<sup>10</sup>  $\delta$  ALAD terekspresikan dalam seluruh jaringan, namun jumlah yang banyak terdapat dalam hati. Konsentrasi dalam hati akan melebihi nilai ambang batasnya apabila terdapat gangguan pada sintesis Citokrom P450.<sup>10</sup> Enzim ALAD bertugas untuk mengkatalisis kondensasi asimetrik dari dua molekul  $\delta$  ALA untuk membentuk porfobilinogen (PBG), suatu prekursor monopirol dari heme, citokrom, dan hemoprotein lainnya. Adanya gangguan pada  $\delta$  ALAD, akan berpengaruh terhadap biosintesis heme dan sintesis citokrome p 450, serta hemoprotein lainnya.<sup>10</sup> Karena berfungsi untuk membentuk porfobilinogen, enzim ALAD juga sering disebut sebagai enzim porfobilinogen sintase. Inhibisi pada eritrosit ALAD akan menimbulkan akumulasi  $\delta$  ALA. Inhibisi ini merupakan indikator yang cukup sensitif pada intoksikasi Pb, sebab Pb yang diabsorpsi tubuh utamanya akan terikat dan tinggal dalam eritrosit.<sup>16</sup> Di samping itu inhibisi oleh Pb yang terjadi pada eritrosit ALAD adalah stoichiometrik, artinya jumlah molekul yang bereaksi dengan molekul hasil reaksi seimbang,<sup>17-19</sup> sehingga adanya inhibisi pada enzim ALAD dapat diukur dan dapat digunakan untuk test rutin pada keracunan Pb di laboratorium kimia klinik.<sup>10</sup>

Purifikasi  $\delta$  ALAD pada beberapa mamalia telah dilakukan dan disimpulkan bahwa ALAD adalah metaloenzim, yang terdiri dari 8 subunit yang identik<sup>20</sup> dan 8 ion Zn.<sup>21-22</sup> Ion Zn sangat esensial bagi kestabilan dan aktivitas enzimatik. Empat ion Zn diperlukan untuk mencegah terjadinya oksidasi pada grup gugus sulfhidril yang terdapat pada tempat aktif (*active site*) enzim, sedangkan empat ion Zn lainnya diperlukan untuk menjembatani masing-masing subunit agar kestabilan struktur homooktomer terpelihara.<sup>22</sup> Pada intoksikasi

Pb, ion Pb akan menggantikan ion Zn pada gugus sulfhidril, sehingga enzim menjadi tidak aktif. Secara in vitro inhibisi ALAD oleh Pb bersifat reversibel bila diinkubasi oleh ion Zn dan dithiothreitol.<sup>22</sup> Gen ALAD yang diekspresikan oleh dua alel yaitu ALAD<sup>1</sup> dan ALAD<sup>2</sup>, dan menghasilkan tiga isozyme yaitu ALAD 1-1, ALAD 1-2, dan ALAD 2-2, mudah disepariasi oleh kanji (*starch*) atau oleh *cellulose acetate gel electrophoresis*.<sup>15</sup> Penelitian pada populasi Kaukasia menunjukkan bahwa keberadaan (frekuensi) gen ALAD<sup>1</sup> dan ALAD<sup>2</sup> adalah 0,9 dan 0,1, sedangkan distribusi dari ketiga genotipe ALAD mengikuti Hardy-Weinberg equilibrium.<sup>23,24</sup> Keberadaan enzim polimorfik yang dapat diinhibisi oleh Pb ini telah memungkinkan adanya hubungan secara fisiologis antara ALAD isozymes dengan keracunan Pb. Meskipun secara esensial aktivitas homozygot ALAD 1-1, heterozygot ALAD 1-2 dan homozygot ALAD 2-2 adalah sama, namun individual yang mempunyai ALAD<sup>2</sup> alel dengan isozyme yang homozygot maupun heterozygot, lebih suseptibel terhadap pemajanan Pb, karena subunit ALAD<sup>2</sup> dapat mengikat Pb lebih kuat dibanding subunit ALAD<sup>1</sup>. Oleh sebab itu individual dengan heterozygot ataupun homozygot ALAD<sup>2</sup> akan mengandung kadar Pb darah lebih tinggi dibanding ALAD<sup>1</sup>, demikian pula individual ini akan lebih mengekspresikan manifestasi subklinik atau klinik dari pemajanan kronik Pb pada dosis rendah, ataupun akut.<sup>9,10,12,14,25</sup> Adanya ALAD<sup>2</sup> alel pada individual juga dapat memodifikasi farmakokinetik dan toksisitas dari Pb, namun mekanisme yang pasti dari modifikasi ini masih belum diketahui secara pasti.<sup>14</sup> Diduga mekanismenya adalah, dengan adanya ALAD<sup>2</sup> alel akan meningkatkan asupan Pb, menurunkan eliminasi, dan/atau memodifikasi distribusi Pb dalam jaringan tubuh, karena adanya peningkatan afinitas dari variant protein terhadap Pb.<sup>14</sup> Indikasi bahwa adanya polimorfisme dalam gen ALAD akan mempengaruhi kinetik dari Pb di dalam tubuh, juga dilaporkan dalam penelitian yang dilakukan terhadap buruh yang bekerja di pabrik peleburan yang potensial mengemisi Pb dalam jumlah banyak di Brunswick Kanada.<sup>14</sup>

Dalam penelitian yang dilakukan terhadap anak di Gebang Sari Kecamatan Genuk Kota Semarang, Sekaran Kecamatan Gunung Pati Kota Semarang, dan Moro Demak Kecamatan Bonang Kabupaten Demak, dari seluruh sampel anak, terdapat dua anak dengan heterozygot ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozyme) atau sekitar 4% (0,04) anak, sisanya anak dengan ALAD<sup>1</sup> (1-1 isozyme), tak satupun sampel anak yang mempunyai 2-2 isozyme. Frekuensi 0,04 ini hampir sama dengan temuan dalam penelitian yang dilakukan terhadap anak di kota New York, yaitu frekuensi anak dengan ALAD<sup>2</sup> sebanyak

0,06.<sup>10</sup> Data dalam penelitian menunjukkan anak dengan ALAD<sup>1</sup> mempunyai kadar rerata Pb darah sebesar  $11,3462 \pm 0,7647$  ppb, sedangkan anak dengan ALAD<sup>2</sup> mempunyai kadar Pb sebesar  $58,1000 \pm 33,6000$  ppb. Data lebih lanjut menunjukkan bahwa anak dengan ALAD<sup>2</sup> (1-2 isozyme) ternyata keduanya mempunyai kadar Pb di atas 20 ppb (91,7 ppb dan 24,50 ppb), ke dua kadar Pb darah ini merupakan kadar Pb darah tertinggi dari sampel penelitian dan berasal dari Moro Demak, sedangkan anak dengan ALAD 1-1 umumnya mempunyai kadar Pb darah di bawah 20 ppb (rerata kadar  $11,3462 \pm 0,7647$  ppb).

Bila dilihat dari median kadar Pb darah, maka dalam penelitian ini anak dengan ALAD<sup>2</sup> alel mempunyai nilai median 58,10 ppb, nilai ini lebih tinggi sekitar 48,60 ppb bila dibanding anak dengan ALAD<sup>1</sup> alel (nilai median kadar Pb darah anak dengan ALAD<sup>1</sup> alel sebesar 10,40 ppb). Tingginya perbedaan ini karena satu anak dengan ALAD<sup>2</sup> alel memiliki kadar Pb darah 91,70 ppb sedangkan satu anak lainnya dengan ALAD<sup>2</sup> alel memiliki kadar Pb darah 24,50 ppb. Meskipun hanya dua anak yang mempunyai ALAD 1-2 isozyme, namun fakta telah menunjukkan bahwa keduanya mempunyai kadar Pb darah yang tinggi, oleh sebab itu dapat dikatakan bahwa dalam penelitian inipun terdapat asosiasi antara ALAD<sup>2</sup> alel dengan tingginya kadar Pb darah. Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian yang telah dilakukan pada tahun 2003 terhadap orang dewasa, yang melaporkan bahwa ALAD<sup>2</sup> alel berasosiasi dengan kadar Pb darah yang tinggi ( $>40$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ).<sup>9</sup> Demikian pula dengan penelitian yang telah dilakukan pada tahun 1991 yang melaporkan bahwa anak dengan ALAD<sup>2</sup> alel yang diekspresikan dalam fenotipe 2-2 atau 1-2 isozyme mempunyai median kadar Pb darah sekitar 9-11  $\mu\text{g}/\text{dl}$  lebih tinggi bila dibanding anak dengan ALAD<sup>1</sup> alel.<sup>10,12</sup>

Pada sekuens ALAD dari tikus, mencit dan manusia hanya terdapat tiga asam amino yang berbeda yang diprediksi terdapat dalam codon 55 sampai 87, salah satunya adalah codon 59. Perbedaan antara polipeptida ALAD<sup>1</sup> dan ALAD<sup>2</sup> terletak pada adanya substitusi lisin oleh asparagin pada residu 59.<sup>12</sup> Keberadaan asparagin di posisi 59 dari ALAD<sup>2</sup> alel pada manusia juga terdapat pada posisi yang sama dalam sekuens ALAD dari tikus dan mencit.<sup>12</sup> Meskipun residu 59 ini letaknya tidak berdekatan dengan tempat ikatan Zn dalam polipeptida ALAD, namun adanya substitusi lisin oleh asparagin pada residu ini, dapat meningkatkan kemampuan enzim untuk menyesuaikan diri dalam ikatan dengan logam (*quarternary conformation*), dengan demikian akan meningkatkan afinitas ikatan enzim terhadap Pb.<sup>12</sup> Data dalam penelitian ini didukung oleh teori tersebut, karena individual anak yang mempunyai ALAD<sup>2</sup> alel

mengandung kadar Pb darah lebih tinggi bila dibanding individual anak dengan ALAD<sup>1</sup> alel. Asosiasi antara kadar Pb darah dengan ALAD genotipe mungkin juga disebabkan karena terjadi saturasi ikatan logam pada tempat lainnya misalnya pada hemoglobin (Hb).<sup>26</sup> Pada dewasa normal Hb mengandung kurang lebih 95-97% HbA, 0,5-3 % HbA<sub>2</sub>, dan 0-2 % HbF.<sup>26</sup> HbA<sub>2</sub> dan HbF cenderung mempunyai afinitas yang tinggi terhadap Pb.<sup>15,27</sup> Pada intoksikasi Pb produksi HbA<sub>2</sub> dan HbF akan meningkat. Begitu saturasi ikatan HbA<sub>2</sub> dengan Pb terjadi, Pb akan beralih ke HbA, bahkan ke membran sel darah merah dan protein sitoplasma, yang umumnya terdiri dari enzim-enzim yang sangat sensitif terhadap Pb antara lain ALAD.<sup>15,27</sup> Dengan demikian tingginya kadar Pb darah yang berasosiasi dengan ALAD<sup>2</sup> yang ditunjukkan dalam penelitian ini dapat juga diterangkan oleh mekanisme tersebut.

Adanya asosiasi antara ALAD<sup>2</sup> heterozygot maupun homozygot dengan tingginya kadar Pb seperti yang telah ditunjukkan oleh kedua sampel anak dari Moro Demak, memberi implikasi bahwa identifikasi gen ALAD pada anak sangat berguna, terlebih lagi bila anak tersebut tinggal di daerah dengan polusi Pb tinggi, serta keadaan sosio-ekonomi rendah. Pemeriksaan sangat berguna tidak hanya untuk anak, namun juga untuk dewasa yang akan bekerja di tempat kerja dengan risiko pajanan Pb yang tinggi. Apabila dari hasil test diketahui bahwa individual tersebut mempunyai gen dengan ALAD<sup>2</sup> alel, maka untuk individual tersebut diperlukan perhatian yang lebih agar tidak terjadi kerusakan organ lebih lanjut. Demikian pula dengan nilai ambang batas (NAB) Pb di tempat kerja atau nilai baku mutu untuk Pb udara ambien perlu dipertimbangkan dengan memperhatikan individual yang mempunyai gen dengan ALAD<sup>2</sup> alel tersebut.

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik simpulan bahwa individual yang mempunyai gen dengan ALAD<sup>2</sup> alel baik yang homozygot (2-2 isozyme) maupun heterozygot (1-2 isozyme) akan mempunyai kadar Pb darah yang lebih tinggi dibanding individual dengan ALAD<sup>1</sup> alel, karena afinitas Pb terhadap ALAD<sup>2</sup> alel lebih tinggi dibanding afinitasnya terhadap ALAD<sup>1</sup> alel. Dengan demikian individual dengan ALAD<sup>2</sup> alel lebih suseptibel terhadap pajanan Pb dibanding individual dengan ALAD<sup>1</sup> alel.

## SARAN

Diperlukan adanya *screening* terhadap anak yang tinggal di daerah dengan cemaran Pb ambien yang tinggi, serta orang dewasa yang akan bekerja di

lingkungan kerja dengan Pb tinggi dengan cara identifikasi gen ALAD. Penelitian lebih lanjut tentang patogenesis dari intoksikasi Pb, serta patofisiologis dari intoksikasi Pb dalam hubungannya dengan gen polimorfik juga diperlukan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Prof. Dr. dr. Ag. Soemantri Sp.A(K) Guru Besar pada Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Prof. Dr. dr. Haryoto Kusnopranto Guru Besar pada Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia, atas segala masukan serta saran-saran dalam penelitian yang dijadikan dasar untuk penulisan artikel ilmiah ini. Peneliti juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Rob Lindeman dari Haematology Laboratory, Prince of Wales Hospital, Randwick, Australia, atas izinnya untuk melakukan ALAD *genotyping* terhadap sampel darah di laboratorium tersebut, serta mengajari cara *genotyping* untuk gen ALAD.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Manahan SE. Toxicological chemistry. New York: Lewis Publishers; 1992.
- Katzung BG. Basic & clinical pharmacology, 9<sup>th</sup> Ed (International Ed). Boston, New York: Mc Graw Hill, 2004;p.1-10.
- Kosnett MJ. Heavy metal intoxication & chelators. In: Katzung BG, editors. Basic & Clinical Pharmacology, 9<sup>th</sup> Ed (International Ed). Boston, New York: Mc Graw Hill, 2004;p.970-81.
- Murray RK. Porphyrins and bile pigments. In: Murray RK, et al, editors. Harper's biochemistry, 25<sup>th</sup> Ed. New York: Appleton & Lange, 2000;p.359-73.
- US. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for lead. Washington D.C. Environmental Protection Agency (EPA-600/8-83/028aF-dF);1986.
- Derelanko MJ, Hollinger MA. Handbook of toxicology. New York: CRC Press;1995.
- Piomelli S. Lead poisoning. In: Nnbleau, Oski, editors. Hematology, 4<sup>th</sup> Ed. New York: WB Sanlea & Company, 1993;p.472-94.
- Moore MR, McColl KE, Rimington C, Goldberg A. Disorders of porphyrin metabolism. New York and London: Plenum Medical Book Company, 1987;p.361.
- Ming-TsangWu, Kelsey K, Schwartz J, Sparrow D, Weiss S, Hu H. A  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism. May modify the relationship of low-level lead exposure to uricemia and renal function: the normative aging study. J Environ Health Perspective. 2003;(111)3:335-40.
- Wetmur JG. Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. Environ Health Perspect. 1994;102(Suppl 3):215-9.
- Batistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, Urbani FR, Caiola S.  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase: A new genetic polymorphism in man. Ann Hum Genet. 1981;45:221-239.
- Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD<sup>2</sup>) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. Am J Hum Genet. 1991;49:757-763.
- Bergdahl IA, Gerhardsson L, Schutz A, Wetmur JG, Skervig S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. Arch Environ Health. 1997;52:91-96.
- Smith CM, Wang X, Howard H, Kelsey KT. A polymorphism in the  $\delta$  aminolevulinic dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. Environ Health Perspect.1995;103:248-253
- Schwartz BS, Lee B, Stewart W, Ahn K, Springer K, Kelsey K. Association of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. Am J Epidemiol. 1995;142: 738-745
- Campbell BC, Meredith PA, Moore RM, Watson WS. Kinetics of lead following intravenous administration in man. Toxicol Lett. 1984; 21:231-235.
- Chisolm JJ Jr, Thomas DJ, Hamill TG. Erythrocyte phorbobilinogen synthase activity as an indicator of lead exposure in children. Clin Chem. 1985; 31:601-605.
- Rogan WJ, Reigart JR, Gladen BC. Association of aminolevulinat dehydratase levels and ferrochelatae inhibition in childhood lead exposure. J Pediatr. 1986; 109:60-64.
- Jaffe EK, Bagla S, Michini PA. Reevaluation of a sensitive indicator of early lead exposure: measurement of porphobilinogen synthase in blood. Biol Trace Element Res. 1991;28:223-231.
- Wu WH, Shemin D, Richards KE, William RC. The quaternary structure of  $\delta$  amino levulinic acid dehydratase from bovine liver. Proc Natl Acad Sci USA. 1974; 71:1767-1770.
- Tsukamoto I, Yoshinaga T, Sano S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochim Biophys Acta. 1979; 570: 167-178.
- Dent AJ, Beyersmann D, Block C, Hasnain SS. Two different zinc site in bovine 5-amino levulinat dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. Biochem. 1990; 29:7822-7828.
- Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. Environ res. 1991; 56:109-119.
- Benkman HG, Bogdanski P, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic dehydratase in various populations. Hum Hered. 1983; 33:62-64.
- Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Davidow B, Desnick RJ.  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase isozymes and lead toxicity. In: EK Silbergeld, BA Fowler, editors. Mechanism in chemical induced porphyrinopathies. Annuals of the New York Academy of Sciences, 1987; 514:23-29.
- Schechter AN. Hemoglobin structure and function. In: Wyngaarden JB, Smith LH, editors. Cecil textbook of medicine. Philadelphia: Harcourt Brace Jovanovich, 1988;p.925-927.
- Raghavan SRV, Culver BD, Gonick HC. Erythrocyte lead binding protein after occupational exposure. Relationship to lead toxicity. Environ Res. 1980; 1980. 2:264-270.

