
AKTIVITAS SPESIFIK MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (*MnSOD*) DAN KATALASE PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK: HUBUNGANNYA DENGAN KERUSAKAN OKSIDATIF

Masagus Zainuri* Septelia Inawati Wanandi**

*Badan Litbangkes, Kemenkes RI, E-mail: Masagus_Zainuria@yahoo.com

**Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI

SPECIFIC ACTIVITY OF MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (*MnSOD*) AND CATALASE IN THE RAT LIVER INDUCED SYSTEMIC HYPOXIA : RELATIONSHIP WITH OXIDATIVE DAMAGE

Abstract

*MnSOD and catalase are endogeneous antioksidants which function to neutralize free radicals. Oxydative stress causes oxidative damage which can be measured by elevated levels of Malondialdehyde (MDA) in the cells. Chronic systemic hypoxia is a condition caused by a systemic decrease in oxygen intake in the long term. This condition can cause oxidative stress that result in oxidative damage to cells in various tissues. Our previous study proved that there are different responses in different rat tissues induced chronic systemic hypoxia. The objective of this study was to analyze specific activity of MnSOD and catalase in mouse liver tissue induced with systemic hipoksia and their association with oxidative damage. Sample in this research is male mouse liver tissue from Sprague Dawley strain (*Rattus novergicus L*), induced with chronic systemic hypoxia for 1,7,14 and 21 days. Mouse liver homogenate tested for specific activity of MnSOD, katalase and MDA. Data showed a decline in specific activity of MnSOD and catalase are significant ($p < 0.05$) accompanied by elevated levels of MDA on day 7 of induction of systemic hypoxia. Also obtained a negative relationship between the specific activity of MnSOD and catalase with the levels of MDA, so that MnSOD and catalase thought to play a role in preventing oxidative damage to lipids in liver cells. From the results of this study can be concluded that the induction of systemic hypoxia of up to 7 days cause oxidative damage to liver cells characterized by increased MDA and followed by a response decrease in antioxidant activity of MnSOD and catalase*

Keyword :MnSOD, Catalase, Oxidative damage. Malondialdehyde, Liver

Abstrak

Enzim MnSOD dan katalase adalah antioksidan endogen yang dapat menangkap dan menguraikan radikal bebas di dalam sel menjadi zat yang kurang reaktif. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan oksidatif lipid yang dapat dideteksi dengan peningkatan kadar Malondialdehyde (MDA) dalam sel. Hipoksia sistemik kronik adalah keadaan yang disebabkan berkurangnya asupan oksigen secara sistemik dalam jangka waktu lama. Keadaan ini dapat menyebabkan stres oksidatif yang berakibat pada kerusakan oksidatif sel dalam berbagai jaringan. Penelitian kami terdahulu membuktikan bahwa terjadi respon yang berbeda pada berbagai jaringan tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas spesifik enzim MnSOD, dan katalase pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik dan hubungannya dengan kerusakan oksidatif. Jaringan hati tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus novergicus L*), diinduksi hipoksia sistemik kronik selama 1,7,14 dan 21 hari. Pada homogenat hati tikus dilakukan pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD, aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Hasil pengamatan menunjukkan terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD dan

katalase yang bermakna ($p < 0,05$) disertai peningkatan kadar MDA pada hari ke-7 induksi hipoksia sistemik. Selain itu didapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik MnSOD dan katalase dengan kadar MDA, sehingga MnSOD dan katalase diduga berperan dalam mencegah kerusakan oksidatif lipid dalam sel hati. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa induksi hipoksia sistemik hingga 7 hari menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel hati ditandai dengan peningkatan MDA dan diikuti dengan respons penurunan aktivitas antioksidan MnSOD dan katalase.

Kata Kunci : MnSOD, katalase, kerusakan oksidatif, malondialdehyde, hati.

Submit: 1 februari 2011, Review 1: 11 Februari 2011, Review 2: 11 Februari 2011, Eligible article: 20 September 2011

Pendahuluan

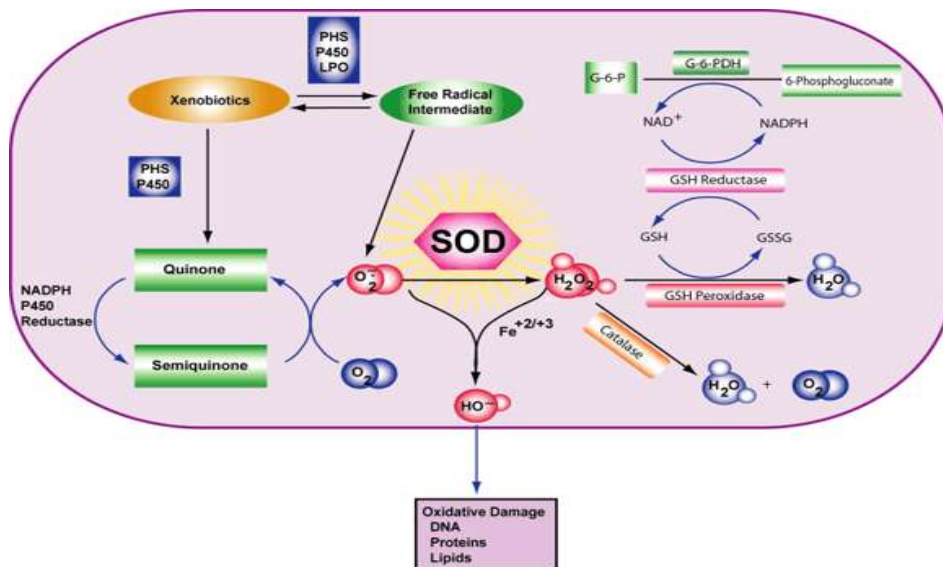
Hipoksia adalah suatu keadaan dimana konsentrasi oksigen dalam sel sangat rendah yang dapat menyebabkan kematian sel. Setiap organisme dapat memberikan respon terhadap keadaan hipoksia, dimana pengaturannya dapat dilakukan pada tingkat sistemik maupun seluler.^{1,2} Dalam keadaan hipoksia terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) oleh mitokondria, kondisi hipoksia menurunkan konsumsi oksigen pada sitokrom c oksidase (kompleks IV mitokondria), sehingga terjadi akumulasi ROS pada kompleks III mitokondria.³

ROS terdiri dari radikal bebas (superoksida, radikal hidroksil, alkoxyl, dan peroxy) dan non radikal (hidrogen peroksida dan hipoklorida).⁴ Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar sehingga bersifat tidak stabil. Radikal bebas berusaha menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel.^{4,5} Jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel.⁶ Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi stres oksidatif adalah peroksidasi lipid yang akan menghasilkan peroksida lipid. Peroksida lipid akan terurai menghasilkan sejumlah senyawa seperti epoksida, hidrokarbon dan aldehyd. Di antara senyawa aldehyd yang dihasilkan adalah

malondialdehyde (MDA).⁷ Beberapa antioksidan endogen yang berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif adalah MnSOD, Katalase dan Glutation tereduksi (GSH).

Aktivitas MnSOD berbeda pada berbagai macam organ dan dipengaruhi oleh beberapa keadaan misalnya hipoksia. Jumlah relatif MnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya. Dewi⁸ melaporkan bahwa sel jantung, otak, dan darah mempunyai pola ekspresi gen dan aktivitas MnSOD yang berbeda pada kondisi hipoksia sistemik kronis. Hal ini menggambarkan respon jaringan yang berbeda-beda. H_2O_2 yang dihasilkan oleh MnSOD akan diuraikan menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim katalase. Pada hewan, katalase terdapat pada semua organ, khususnya di hati yang merupakan organ metabolik terbesar dan terpenting di tubuh.⁹

Beberapa fungsi hati antara lain adalah untuk pengolahan metabolit nutrisi utama (karbohidrat, lemak, protein), detoksifikasi atau degradasi zat-zat sisa, sintesis berbagai protein plasma dan penyimpanan glikogen.¹⁰ Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenus). Gradien oksigen ini makin bertambah karena adanya proses metabolisme yang mengkonsumsi oksigen pada sel-sel parenkim dan membuat tekanan oksigen menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35 mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam



Gambar 1. Mekanisme pembentukan MDA serta peran antioksidan endogen Enzim MnSOD dan Katalase.¹¹

regulasi gen yang mengkode enzim-enzim untuk metabolisme karbohidrat. Sebagai contoh, enzim-enzim glikolisis seperti piruvat kinase ekspresinya menguat pada area yang kurang aerob yaitu zona perivenus, sedangkan enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan ekspresinya di zona periportal yang lebih aerob.¹² Mengingat pentingnya peran oksigen pada aktivitas enzim di hati dan berbedanya aktivitas MnSOD pada berbagai jaringan maka pada penelitian ini akan dianalisis aktivitas spesifik MnSOD dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik dan hubungannya dengan kerusakan oksidatif.

Bahan dan Metode

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dilakukan departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pada penelitian besar ini tikus diberi perlakuan hipoksia didalam *hypoxia chamber* dengan konsentrasi oksigen 10% dan nitrogen 90%.

Bahan

Hati hewan coba yang digunakan adalah hati tikus jantan strain Sprague Dawley berumur 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram.

Pengambilan sampel hati tikus

Jumlah sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer,¹³ sampel dibagi menjadi lima kelompok, kelompok hipoksia 1,7,14, 21 hari dan kontrol dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 sampel. Adanya hipoksia yang terjadi, ditunjukkan dengan penurunan bertahap pO₂ dan pCO₂ darah tikus, serta penurunan hematokrit yang merupakan tanda berkurangnya jumlah sel darah merah didalam darah.¹⁴ Untuk melihat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik uji-T. Untuk melihat adanya hubungan yang bermakna antara aktivitas spesifik MnSOD dan katalase dengan kerusakan oksidatif digunakan uji korelasi pearson.

Pembuatan homogenat hati

Untuk pembuatan homogenat hati yang akan dipergunakan untuk pemeriksaan MDA dan katalase, menggunakan jaringan hati dengan berat ± 100 mg, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD menggunakan jaringan hati dengan berat 50mg. Untuk pemeriksaan MDA dan katalase, jaringan hati dilumatkan dengan micropestle dan homogenizer dalam 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7.0 dan PMSF, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD, jaringan hati dilumatkan dengan menggunakan

micropestle dan homogenizer dalam 50 µl *nuclei lysis solution* dan PMSF. Homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang dalam tabung yang bersih dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

Pemeriksaan aktivitas spesifik enzim MnSOD

Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia yaitu dengan menggunakan kit RanSOD[®].⁸ Aktivitas SOD total ditetapkan dari derajat penghambatan pembentukan warna formazan ini yang diukur dengan spektrofotometer A 505 nm. Reagen-reagen pada kit ini terdiri dari mixed substrate yang mengandung xantin, buffer fosfat, xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar. Sebanyak 25µl sampel/standar dimasukkan ke dalam kuvet, lalu ditambahkan *mixed substrate* dan campur dengan baik. Untuk menghambat Cu/ZnSOD, sebanyak 5µl natrium sianida 5 mM ditambahkan ke dalam campuran tersebut dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan enzim xantin oksidase dan serapan cahaya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detik pertama setelah penambahan enzim (A₁) dan 3 menit kemudian (A₂).

$$\begin{aligned} \text{Perhitungan} &= \Delta A/\text{menit} \text{ (sampel maupun standar)} \\ &= \frac{A_1 - A_2}{3} \end{aligned}$$

Kecepatan sampel diluents (S1) = kecepatan reaksi yang tidak diinhibisi = 100%

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{100 - (\Delta A \text{ std/mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/mnt})} \\ &= \frac{100 - (\Delta A \text{ sampel/mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/mnt})} \end{aligned}$$

% inhibisi sampel yang diperoleh dimasukkan pada kurva log 10/semilog standar.

Pemeriksaan aktifitas spesifik enzim katalase.

Pemeriksaan aktivitas spesifik katalase dilakukan dengan menggunakan metode Mates.¹⁵ Pengenceran sampel optimum 500X dan waktu optimum pada saat menit ke-2. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 210 nm, setelah blangko atau sampel uji dicampur dengan H₂O₂ reaksi akan berjalan, t₀ adalah 30 detik setelah pencampuran, t₁ adalah 1 menit setelah t₀, dan seterusnya.

Pemeriksaan kadar MDA

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri.¹⁶ Sebanyak 400 µl sampel direaksikan dengan 200 µl *trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk deproteinisasi. Kemudian divorteks dan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan tambahkan 400 µL TBA 0,67%. Selanjutnya sampel divorteks dan diinkubasi dalam pemanas air pada suhu 96°C, 10 menit kemudian angkat dan dinginkan pada suhu ruang. Kemudian baca serapan pada panjang gelombang 530 nm.

Hasil dan Pembahasan

Secara keseluruhan terlihat pola berlawanan antara aktivitas spesifik MnSOD atau aktivitas spesifik katalase dengan aktivitas MDA (Gambar 2). Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik MnSOD dan MDA (R= -0.442, p<0.05) dan hubungan negatif antara aktivitas spesifik katalase dan



Gambar 2. Perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase dengan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1, 7, 14 dan 21 hari

★berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$)

MDA ($R = -0.326$, $p > 0.05$). Hal ini menunjukkan adanya peran enzim-enzim tersebut dalam menghambat terjadinya kerusakan oksidatif. Perubahan pola terjadi pada hari ke-7 hipoksia. Peningkatan kadar MDA sampai hari ke-7 kemudian menurun pada hari berikutnya, sedangkan aktivitas spesifik MnSOD dan katalase menurun sampai hari ke-7 kemudian meningkat pada hari berikutnya.

Kenaikan kadar MDA terjadi sampai hipoksia hari ke-7 disertai dengan penurunan aktivitas antioksidan MnSOD dan katalase. Hal ini disebabkan peningkatan kadar ROS yang berlebihan sehingga melampaui kapasitas MnSOD dan katalase yang selanjutnya dapat menimbulkan stres oksidatif dan mengakibatkan terjadinya kerusakan berbagai makromolekul dalam sel (kerusakan oksidatif). Peningkatan kadar MDA menunjukkan meningkatnya kerusakan oksidatif lipid akibat terjadinya hipoksia. Penelitian yang dilakukan Halim¹² menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

Dewi⁸ melaporkan bahwa pada jaringan jantung dan darah, pada kondisi hipoksia 1 hari terjadi penurunan aktivitas MnSOD dan ekspresi mRNA MnSOD. Hati merupakan tempat metabolisme utama, sehingga jumlah ROS yang terbentuk di hati akan lebih banyak dibandingkan yang terdapat dalam jantung dan darah. Hal ini yang menyebabkan penurunan aktivitas MnSOD sampai hari ketujuh pada hipoksia di hati.

Aktivitas spesifik enzim katalase secara keseluruhan mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol. Pada tikus hipoksia 7 dan 21 hari, penurunan aktivitas enzim katalase secara statistik bermakna bila dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Katalase merupakan enzim yang berperan untuk mengkonversi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Penurunan aktivitas katalase pada hipoksia diduga disebabkan karena menurunnya aktivitas MnSOD. Aktivitas MnSOD yang menurun akan menyebabkan menurunnya kadar H_2O_2 sebagai substrat katalase. Gambar 2 memperlihatkan pola yang sama antara MnSOD dan katalase, hal ini menunjukkan bahwa katalase bekerja sejak dari hipoksia 1 hari. Diketahui bahwa katalase bekerja pada konsentrasi H_2O_2 yang tinggi,⁹ sehingga dapat disimpulkan pada kondisi hipoksia 1 hari telah terjadi produksi H_2O_2 yang tinggi oleh MnSOD. Pada hipoksia 21 hari peran katalase sebagai *scavenger* H_2O_2 terlihat

menurun, keadaan ini disebabkan adanya sistem lain yang bekerja sebagai *scavenger* H_2O_2 . Antioksidan lain yang dapat berperan sebagai *scavenger* H_2O_2 misalnya GSH (glutathion tereduksi).⁹ GSH dapat disintesis di semua sel, namun kadar GSH tertinggi ditemukan di jaringan hati.² Aktivitas MnSOD terdapat pada mitokondria sedangkan mitokondria sel hati hanya mengandung sedikit katalase.⁹ Katalase banyak terdapat pada peroksisom, H_2O_2 sebelum sampai ke peroksisom dikonversi terlebih dahulu oleh GSH yang banyak terdapat pada sitosol sel hati. Sebelumnya telah dilaporkan bahwa GSH digunakan sejak hari pertama hipoksia, dari penelitian ini didapat penurunan yang bermakna dari kadar GSH pada tikus hipoksia 1,3,7, dan 14 hari bila dibandingkan dengan kontrol.¹²

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa induksi hipoksia sistemik hingga 7 hari menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel hati ditandai dengan peningkatan MDA dan diikuti dengan respons penurunan aktivitas antioksidan MnSOD dan katalase.

Daftar Pustaka

- 1 Semenza GL. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88:1474-80.
- 2 Haddad JJ. 2002. Oxygen sensing mechanism and regulation of redoxresponsive transcription factors in development and physiology. *Respir Res*, 3:1-27.
- 3 Zagorska A, Dulak J. 2004. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*, 5:437-46.
- 4 Bag A, Bag N. 2008. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 17(12):3298-305.
- 5 Harju T, Wiik RK, Sirvio R, Paakko P, Crapo JD, Oury TD, et al. 2004. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *Eur Respir J*, 24:765-71
- 6 Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH. 1998. Smoking associated

-
-
- mitochondrial DNA mutation and lipid peroxidation in human lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19:901-9.
- 7 Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Cellular Responses to Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, Senescence and Death*. In *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London: Oxford. University Press, 187-267
- 8 Dewi S. 2008. *Eksresi gen Manganese superoxide dismutase pada jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik*. Tesis, Fakultas kedokteran. Jakarta: Universitas Indonesia.
- 9 Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Antioxidant Defences Endogenous and Diet Derived*. In *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London: Oxford. University Press ; : 79-186.
- 10 Sherwood L. 2001. *Fisiologi manusia.edisi 2*. Jakarta: EGC.
- 11 Oberley. Cell signaling enzyme. [cited 2010 april 12]. Available from:<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/superoxide-dismutase.html>
- 12 Halim A. 2008. *Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik*. Tesis, Fakultas kedokteran. Jakarta: Universitas Indonesia.
- 13 Hanafiah, Kemas A. 2005. *Rancangan percobaan: teori dan aplikasi*. Jakarta: Raja grafindo persada
- 14 Ferdinal F. 2008. *Mekanisme molekuler gagal jantung yang diinduksi hipoksia : peran HIF-1 α dalam regulasi gen BNP*. Disertasi, Fakultas kedokteran. Jakarta: Universitas Indonesia.
- 15 Muradian KK, et al. 2002. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: linear regression and correlation. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 35: 205–214
- 16 Rio DD, Steward AJ, Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*.15: 316-328