

617
EKA

PTF 3

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**Aktivitas Spesifik Enzim
Manganese Superoxide Dismutase(MnSOD)
pada Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik:
Hubungannya dengan Stres Oksidatif dan Fungsi Hati**

MASAGUS ZAINURI

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
PERPUSTAKAAN

Tanggal : _____

No. Induk : _____

No. Klass : **617**
EKA

Badan Litbangkes Kemenkes RI
2010



Jl. Pemerintahan Negara No. 29
Jakarta 10560
Kode Pos 10220
Jakarta 10012
Telepon (021) 4243933

DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN



Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERJANJIAN PELAKSANAAN PENELITIAN

Nomor : *PR. 01.05/IV/006/2010*

ANTARA

KEPALA BADAN PENGEMBANGAN DAN PENELITIAN KESEHATAN

DEPARTEMEN KESEHATAN

DENGAN

KETUA PELAKSANA PENELITIAN

Tentang

PELAKSANAAN PENELITIAN AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM MNSOD PADA HATI TIKUS YANG
DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK : HUBUNGANNYA DENGAN STRES OKSIDATIF
DAN FUNGSI HATI

Pada hari ini Senin tanggal empat bulan Januari tahun dua ribu sepuluh, kami yang bertandatangan di bawah ini :

1. Prof. Dr. dr. Agus Purwadianto, SH, M.Si, SpF(K) : Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, yang berkedudukan dan berkantor di Jalan Percetakan Negara Nomor 29 Jakarta 10560, dalam hal ini bertindak dalam jabatannya untuk dan atas nama Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Selanjutnya disebut "PIHAK KESATU".

2. drg. Masagus Zainuri : Ketua Pelaksana Penelitian "Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik : Hubungannya Dengan Stres Oksidatif Dan Fungsi Hati", Selanjutnya disebut "PIHAK KEDUA".

Selanjutnya "PIHAK KESATU" dan "PIHAK KEDUA" disebut sebagai "PARA PIHAK". Mempertimbangkan kepentingan PARA PIHAK untuk melakukan kerjasama dalam pelaksanaan penelitian sesuai dengan peraturan dan ketentuan yang berlaku.

Pernyataan Pelaksanaan Penelitian "Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik : Hubungannya Dengan Stres Oksidatif Dan Fungsi Hati" diberikan berdasarkan ketentuan-ketentuan yang diatur dalam pasal-pasal di bawah ini:

PASAL I
MAKSUD DAN TUJUAN

Maksud : Mengetahui peran aktivitas spesifik MnSOD dalam mencegah terjadinya stres oksidatif pada hati, serta mengetahui hubungan kerusakan oksidatif dan aktivitas spesifik GPT sebagai indikator kerusakan hati.



DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BANDAR PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Merdeka Selatan No. 29
Kebayoran Baru
Jakarta 12116
Telp. (021) 423933

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>



Tujuan :

1. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
2. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
3. Menentukan aktivitas spesifik katalase dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
4. Menentukan aktivitas spesifik katalase dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
5. Menentukan aktivitas spesifik GPT dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
6. Menentukan aktivitas spesifik GPT dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
7. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan aktivitas spesifik katalase pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

PASAL II
RUANG LINGKUP

Ruang lingkup perjanjian meliputi pelaksanaan kegiatan, pembiayaan, jangka waktu pelaksanaan tata cara pembayaran serta kewajiban para pihak.

PASAL III
JUDUL PENELITIAN DAN JANGKA WAKTU PELAKSANAAN

1. **Judul Penelitian :** Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik : Hubungannya Dengan Stres Oksidatif Dan Fungsi Hati
2. **Waktu Pelaksanaan:** 6 bulan, dari bulan Januari sd. Juni 2010

PASAL IV
PEMBIAYAAN DAN TATA CARA PEMBAYARAN

1. Biaya yang disediakan untuk penelitian ini dibebankan pada DIPA Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan No. 0056.0/ 024-11.1/-/2010 tanggal 31 Desember 2010.
2. Biaya tersebut merupakan biaya maksimum yang tidak boleh terlampaui. Dirinci dalam pos pengeluaran sebagai berikut:
 - Belanja Honor Yang Terkait Dengan Output Kegiatan Rp. 25.700.000,-
 - Belanja Bahan Rp. 50.826.000,-



**DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN**



Jl. Perintakan Negara No. 29
10560
Kota Pos 1226 Jakarta 10012
Telep. (021) 4261088

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>

- Belanja Sewa	Rp. 3.000.000,-
- Belanja Barang Non Operasional Lainnya	Rp. 500.000,-
- Belanja Jasa Profesi	Rp. 13.800.000,-
- Belanja Perjalanan Lainnya	Rp. 1.000.000,-

	Jumlah seluruhnya
	Rp. 94.826.000,-

3. Penyediaan biaya untuk keperluan kegiatan yang dimaksud akan diberikan secara bertahap dan merupakan uang-uang yang harus dipertanggungjawabkan oleh Ketua Pelaksana serta Penyelesaian pertanggungjawaban keuangan menjadi syarat untuk pemberian biaya bulan berikutnya.
4. a. Ketua Pelaksana mengajukan Surat Permintaan Pembayaran kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan untuk membiayai kegiatan penelitian setiap bulan.
b. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan memberikan persetujuan pembayaran setelah persyaratan yang dikaitkan dengan laporan kegiatan penelitian dan penyelesaian pertanggungjawaban keuangan bulan yang lalu sudah dipenuhi secara lengkap.
5. Tata cara pertanggungjawaban harus sesuai dengan ketentuan yang telah ditetapkan dan atau petunjuk penggunaan anggaran Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2009.

**PASAL V
HAK DAN KEWAJIBAN**

PIHAK KESATU

HAK :

1. Mendapatkan kepastian pelaksanaan penelitian sesuai dengan kesepakatan.
2. Mendapatkan laporan dan hasil pelaksanaan penelitian.
3. Mendapatkan dokumen yang berhubungan dengan pelaksanaan penelitian sewaktu-waktu dibutuhkan.

KEWAJIBAN:

Melakukan pembayaran pelaksanaan kegiatan penelitian kepada PIHAK KEDUA sesuai dengan tahapan pembayaran.

PIHAK KEDUA

HAK

1. Mendapatkan dokumen yang berhubungan dengan pelaksanaan kegiatan sewaktu-waktu dibutuhkan.
2. Mendapatkan pembayaran atas pelaksanaan kegiatan penelitian dari PIHAK KESATU sesuai dengan tahapan pembayaran.

KEWAJIBAN :

1. Mengajukan nama-nama tim peneliti dan petugas lainnya yang akan membantu pelaksanaan kegiatan, disertai penjelasan tugas-tugas dan jangka waktu penugasan



Jl. Permekan Negara No. 29
Jakarta 10560
Kota: Pos 1226 Jakarta 10012
Telp. (021) 4261088

DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
**BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN**

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>



2. Wajib membuat dengan segera Protokol kegiatan secara lengkap yang menjelaskan seluruh aspek kegiatan untuk digunakan sebagai pegangan dalam pelaksanaan kegiatan, dengan lampiran : jadwal kegiatan per bulan secara rinci, kebutuhan biaya per bulan, dan tabel-tabel kegiatan yang akan muncul dalam laporan kegiatan.
Protokol dikirim kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan melalui Pihak Kesatu
3. Melaksanakan penelitian dan bertanggung jawab penuh atas hasil penelitian.
4. Wajib menyampaikan laporan akhir dan hasil pelaksanaan kegiatan penelitian kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan paling lambat tanggal 5 setelah bulan bersangkutan berakhir.
5. Wajib menyelesaikan/mempertanggungjawabkan keuangan untuk setiap bulan dan membuat laporan pertanggungjawaban keuangan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan selambat-lambatnya tanggal 25, bulan berjalan.
6. Wajib membuat dan menyampaikan draft laporan akhir hasil kegiatan sebanyak 10 copy untuk dibahas oleh Panitia Pembina Ilmiah (PPI) dan disampaikan dalam seminar di lingkungan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
7. Wajib menyempurnakan laporan akhir kegiatan sesuai dengan saran dan petunjuk PPI, kemudian menyerahkan sebanyak 5 copy kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dengan memberikan tembusan kepada Pihak Kesatu.
8. Pada akhir kegiatan wajib menyerahkan barang-barang/peralatan hasil pengadaan kegiatannya kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan untuk diserahterimakan bersama-sama dengan Laporan kegiatan, menjadi barang milik Negara dengan Berita Acara Serah Terima dan menyimpan segala dokumen yang berhubungan dengan pelaksanaan penelitian.

**PASAL VI
PELAPORAN**

1. Tata Cara Penulisan Laporan harus mengikuti ketentuan yang telah ditetapkan
2. Laporan akhir kegiatan sosialisasi pemeriksaan laboratorium yang sudah disempurnakan harus disertai dengan naskah ilmiah dalam bentuk siap untuk dipublikasi

**PASAL VII
PEMBINAAN DAN PENGAWASAN**

1. Pembinaan teknis dan administratif serta pengawasan terhadap pelaksanaan kegiatan ini dilakukan oleh Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Pembinaan teknis dan administratif serta pengawasan dilakukan secara terus menerus. Ketua Pelaksana wajib memberikan kesempatan serta memberikan keterangan-keterangan yang diminta. Pembinaan tersebut dapat dilakukan dalam bentuk Progress Report dan Supervisi ke lokasi penelitian. Supervisi dilakukan oleh Komisi Ilmiah (KI) Badan Litbangkes Kementerian kesehatan RI.



**DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN**

Jl. Pemuda Negara No. 29
Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012
Tele. (021) 4261088

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>



3. Apabila dipandang perlu Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dapat melakukan atau menunjuk pejabat lain untuk melakukan pengawasan.

**PASAL VIII
KETENTUAN LAIN**

1. Segala penemuan dan hasil kegiatan ini menjadi milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Hasil kegiatan ini harus diterbitkan di dalam Buletin Penelitian Kesehatan. Apabila naskah ilmiah hendak diajukan ke majalah lain, atau suatu pertemuan ilmiah, supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan dari Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

**PASAL IX
SANKSI**

1. Apabila protokol kegiatan, laporan pertanggungjawaban keuangan dari laporan kemajuan penelitian tidak masuk pada waktunya, maka akan diberikan teguran tertulis melalui atasannya dan pemberian uang muka ditangguhkan.
2. Apabila Ketua Pelaksana atau Peneliti yang terlibat dalam penelitian belum menyelesaikan naskah ilmiah dari hasil kegiatan, maka akan diberi sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.
3. Apabila Ketua Pelaksana belum menyelesaikan laporan akhir kegiatan maka ia tidak akan dipertimbangkan menjadi Ketua Pelaksana atau Peneliti Utama untuk penelitian lain serta kegiatan ilmiah lain yang ditentukan oleh Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
4. Apabila seorang peneliti menerbitkan hasil penelitian milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan di luar Buletin Penelitian Kesehatan tanpa seizin Kepala Badan Litbang Kesehatan, maka yang bersangkutan:
 - a. Akan diadakan teguran tertulis melalui atasannya
 - b. Akan dipertimbangkan kesalahan yang diperbuat sebelumnya, apabila ia mengajukan usulan penelitian tahun-tahun berikutnya.
5. Apabila seorang peneliti membawakan hasil penelitian yang belum dapat persetujuan Kepala Badan Litbang Kesehatan di dalam suatu pertemuan yang bersifat umum, maka kepada yang bersangkutan :
 - a. Akan diadakan teguran tertulis melalui atasannya
 - b. Akan dipertimbangkan kesalahan yang diperbuat sebelumnya, apabila ia mengajukan usulan penelitian tahun-tahun berikutnya.



DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Hermetakan Negara No. 29
Dukuhnoe 00560
Kamuk Pas 1226 Jakarta 10012
Telepon (021) 4261088

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>



PASAL X
PENYELESAIAN PERSELISIHAN

1. Apabila terjadi perselisihan antara kedua belah pihak, maka pada dasarnya akan diselesaikan secara musyawarah.
2. Apabila perselisihan tidak dapat diselesaikan dengan cara musyawarah, maka perselisihan tersebut akan diselesaikan melalui Badan Arbitrase resmi atau akan dibentuk Panitia Penyelesaian Perselisihan yang terdiri dari 3 (tiga) orang, yaitu:
 - a. seorang wakil dari PIHAK KESATU;
 - b. seorang wakil dari PIHAK KEDUA;
 - c. dan seorang wakil yang ditunjuk dan disetujui oleh kedua belah pihak.
3. Apabila keputusan yang dibuat sebagaimana tersebut pada ayat 2 pada pasal ini tidak diterima oleh salah satu atau kedua belah pihak, maka penyelesaian akan diteruskan melalui Kantor Pengadilan Negeri.

PASAL XI
PENUTUP

1. Apabila terdapat perubahan dalam perjanjian ini akan dilakukan perbaikan berdasarkan kesepakatan dari Para Pihak dan merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari perjanjian ini.
2. Perjanjian ini dibuat dalam rangkap 2 (Dua) asli, masing-masing sama bunyinya, dan dibubuhki materai, mempunyai kekuatan hukum yang sama, dan ditanda tangani oleh kedua belah pihak.

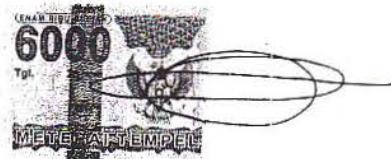
PIHAK KESATU

Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan
Kesehatan

Prof. Dr. dr. Agus Purwadianto, SH, M.Si, SpF(K)
NIP. 19541109 198003 1 004

PIHAK KEDUA

Ketua Pelaksana



drg. Masagus Zainuri
NIP. 198007072008011014



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go.id

Yang terhormat,
Sekretaris Badan Litbangkes
Jl. Percetakan Negara No.29
Jakarta Pusat

Sehubungan dengan perubahan judul tesis yang diajukan sebagai tugas akhir Program S2 di FKUI, yang dibiayai dari DIPA Sekretariat Badan Litbang Kesehatan atas nama :

Nama : drg. Masagus Zainuri
NIP : 198007072008011014
Jabatan: Staf Program dan Kerjasama
Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan
Judul awal : "AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM MANGANESE SUPEROKSIDA DISMUTASE (MNSOD) PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPO"
Judul baru : "AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (MNSOD), PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK : HUBUNGANNYA DENGAN STRES OKSIDATIF DAN FUNGSI HATI"

Sebagai persyaratan administrasi perubahan judul tersebut harus merevisi judul yang ada dalam POK Sekretariat Badan Litbang Kesehatan. Maka dengan ini kami mohon persetujuan Ibu untuk perubahan judul di Petunjuk Operasional Kegiatan (POK) Sekretariat Badan Litbang Kesehatan TA 2010. Sebagai bahan pertimbangan kami informasikan bahwa penelitian ini telah dimulai sejak bulan Januari dan telah selesai pada bulan Juni 2010.

Atas perhatian dan pertimbangan Ibu, kami ucapkan terima kasih.

Mengetahui,
Kepala Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan



Jakarta, 23 Agustus 2010

drg. Masagus Zainuri
NIP 198007072008011014

Tembusan :

Ketua PPI Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan

KATA PENGANTAR

Laporan hasil penelitian berisikan hasil penelitian yang berjudul aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik: Hubungannya dengan stres oksidatif dan fungsi hati. Penelitian ini dibuat dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik, pada Program Magister Ilmu Biomedik, Kekhususan Biokimia pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Semula penelitian ini berjudul aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia, namun setelah berkonsultasi dengan pembimbing terjadi pergantian judul menjadi aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik: Hubungannya dengan stres oksidatif dan fungsi hati. Penelitian ini bermanfaat sebagai penelitian dasar mengenai peran antioksidan endogen di hati untuk mencegah terjadinya kerusakan hati. Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Badan Litbangkes Kemenkes RI sebagai sumber dana dari penelitian ini.

RINGKASAN EKSEKUTIF

Judul : Aktivitas Spesifik Enzim *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)* pada Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik: Hubungannya dengan Stres Oksidatif dan Fungsi Hati

Nama Penyusun : Masagus Zainuri

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. 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. ROS terdiri dari radikal (superoksida, radikal hidroksil, alkoxyl, dan peroxyl) dan non radikal (hidrogen peroksida dan hipoklorida). 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 tetap menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel. Jika keseimbangan tersebut terganggu akan timbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel. Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi stres oksidatif adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan hasil reaksi yang bersifat merugikan dalam tubuh. Peroksidasi lipid akan terurai menghasilkan sejumlah senyawa seperti epoksida, hidrokarbon dan aldehid. Di antara senyawa aldehid yang dihasilkan adalah Malondialdehid (MDA). Pada tingkat seluler, kerusakan protein dapat terjadi secara langsung oleh serangan radikal bebas atau tidak langsung melalui kerusakan sekunder akibat serangan produk peroksidasi lipid. Beberapa residu asam amino pada protein terutama histidin, lisin, arginin, prolin dan treonin, jika mengalami oksidasi akan membentuk senyawa karbonil yang dapat diukur setelah deoksikan dengan 2,4-dinitrophenylhidrazine.

Superoxide dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida (O_2^-) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Pada sel eukariotik terdapat tiga isoform SOD yaitu *copper-zinc superoxide dismutase* (Cu/ZnSOD), SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan *manganese superoxide dismutase*

(MnSOD). MnSOD adalah enzim homotetramer yang mengikat satu ion Mn per subunit. MnSOD terdapat banyak pada mitokondria, oleh karena itu jumlahnya pada suatu jaringan tergantung banyak tidaknya mitokondria pada jaringan tersebut. Pada eritrosit mamalia mana tidak terdapat mitokondria, tidak ditemukan MnSOD, sedangkan pada hati tikus aktivitas MnSOD merupakan 10% aktivitas total SOD. Aktivitas MnSOD berbeda pada berbagai macam organ dan dipengaruhi oleh beberapa keadaan misalnya hipoksia. Jumlah aktif MnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya. Penelitian yang dilakukan di laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 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.

Hati adalah organ metabolismik terbesar dan terpenting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama (karbohidrat, lemak, protein), detoksifikasi atau degradasi zat-zat sisa, sintesis berbagai protein plasma dan penyimpanan glikogen. Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari 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 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam 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.

Enzim glutamat piruvat transaminase (GPT) mengkatalisis reaksi perubahan asam amino alanin dan α -ketoglutarat menjadi piruvat dan glutamat. Enzim GPT banyak disintesis dan memiliki aktivitas paling tinggi di sel hati. Apabila terjadi kerusakan hati, akan terjadi gangguan sintesis enzim GPT, yang menyebabkan menurunnya aktivitas GPT di hati. Pada kerusakan hati enzim GPT akan dikeluarkan ke dalam darah sehingga kadar SGPT menjadi tinggi. Hal ini yang menyebabkan aktivitas enzim GPT pada darah, digunakan sebagai petanda terjadinya kerusakan hati.

Pada penelitian ini dianalisis aktivitas spesifik MnSOD, katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik dan hubungannya dengan stres

oksidatif. Penelitian ini berikanfaat untuk mengetahui peran MnSOD dan katalase (antioksidan endogen) dalam mencegah terjadinya kerusakan oksidatif, serta mengetahui hubungan kerusakan oksidatif dan aktivitas spesifik GPT sebagai indikator kerusakan hati.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat diambil adalah :

1. Tidak terjadi perubahan bermakna aktivitas spesifik MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik
2. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik MnSOD dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan senyawa karbonil negatif lemah.
3. Aktivitas spesifik katalase mengalami penurunan pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Penurunan bermakna terjadi pada hipoksia 7 dan 21 hari
4. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik katalase dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik katalase dan senyawa karbonil negatif lemah.
5. Tidak terjadi perubahan bermakna aktivitas spesifik GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik
6. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik GPT dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik GPT dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik GPT dan senyawa karbonil negatif lemah.
7. Terdapat hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Saran yang dapat diberikan adalah :

1. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi, untuk memastikan keadaan sel hati sebenarnya.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai peran antioksidan piruvat pada keadaan hipoksia lanjut di hati.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sistem pertahanan antioksidan di hati dan yang membedakannya dengan jaringan lain, sehingga hati menjadi lebih tahan terhadap kerusakan oksidatif.

ABSTRAK

Nama :Masagus Zainuri
Program Studi :Ilmu Biomedik
Judul :Aktivitas spesifik enzim *manganese superoxide dismutase* pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik: Hubungannya dengan kerusakan oksidatif dan fungsi hati

Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas spesifik enzim MnSOD, katalase dan GPT pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik dan hubungannya dengan stres oksidatif. Sampel penelitian ini adalah jaringan hati tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L*), yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 1,7,14 dan 21 hari. Pada homogenat hati tikus dilakukan beberapa pemeriksaan, yaitu pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD, aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik enzim GPT, kadar MDA dan pemeriksaan senyawa karbonil. Dari penelitian ini didapatkan hasil tidak adanya perubahan bermakna pada aktivitas spesifik MnSOD, GPT, dan kadar karbonil. Pada hipoksia 7 dan 21 hari terjadi penurunan bermakna aktivitas spesifik katalase, dan kadar MDA menurun bermakna pada hipoksia 21 hari. Dari hasil analisis, didapat hubungan negatif antara MnSOD dan katalase dengan kerusakan oksidatif, disimpulkan bahwa MnSOD dan katalase berperan dalam mencegah kerusakan oksidatif. Analisis hubungan aktivitas spesifik GPT dengan kerusakan oksidatif didapat hubungan negatif. Hal ini mengindikasikan bahwa penurunan GPT di hati dapat dipakai sebagai indikator kerusakan oksidatif. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa jaringan hati memiliki sistem pertahanan antioksidan yang adekuat, sehingga sel hati cukup tahan terhadap terjadinya kerusakan oksidatif.

Kata Kunci : Hipoksia sistemik kronik, stres oksidatif, aktivitas MnSOD, aktivitas katalase, aktivitas GPT.

ABSTRACT

Name : Masagus Zainuri
Study Program : Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Indonesia
Title : Specific activities of manganese superoxide dismutase, catalase and GPT in rat liver tissue induced by systemic hypoxia: Relation to oxidative damage

The aim of this study was to analyze the specific activities of MnSOD, catalase and GPT in rat liver cells induced by systemic hypoxia related to oxidative stress. The samples were obtained from liver tissue of Sprague Dawley rats at days 1, 7, 14, and 21 of chronic systemic hypoxia and were used to measure specific activity of MnSOD, catalase, GPT, and the levels of MDA, and protein carbonyls. Results showed that there were not significant alteration of specific activity of MnSOD, of GPT, and levels of carbonyls. At days 7 and 21 of hypoxic induction, there were significant decrease of catalase specific activity. Levels of MDA significant decreased at days 21. Based on correlation analyzing it can be concluded that MnSOD and catalase had a role in prevent oxidative damage. Correlation analyzing of GPT specific activity and oxidative damage showed negative correlation. This means that decreased of GPT specific activity in liver could be used as oxidative damage indicator. It is concluded that liver tissue provided with adequate antioxidant defense mechanism which makes liver cells survive during hypoxic oxidative insult.

Key words: systemic hypoxia, oxidative stress, MnSOD activity, GPT activity, catalase activity

Susunan Tim Peneliti

Nama	Kedudukan dalam Tim
Masagus Zainuri	Ketua
Ondi arif	Anggota
Dr. rer. Physiol., dr. Septelia Inawati Wanandi	Konsultan
drg. Dwirini, M.Biomed	Konsultan

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
SK PENELITIAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN EKSEKUTIF	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
SUSUNAN TIM PENELITI	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Pertanyaan Penelitian.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Kerangka Teori	5
1.6 Kerangka Konsep.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hipoksia.....	7
2.2 Stres Oksidatif.....	8
2.2.1 Radikal Bebas dan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	8
2.2.2 Antioksidan.....	12
2.3 <i>Manganese Superoxide Dismutase</i> (MnSOD)	14
2.4 Katalase.....	16
2.5 Enzim Glutamat Piruvat Transaminase	17
2.6 Hati.....	19
2.6.1 Struktur Hati.....	20

2.6.2 Aliran Darah Hati.....	22
2.6.3 Fungsi Hati.....	23
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Desain Penelitian	25
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
3.3 Sampel Penelitian.....	25
3.4 Jumlah Sampel Penelitian.....	26
3.5 Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.5.1 Bahan Penelitian	26
3.5.2 Alat Penelitian.....	26
3.6 Cara Kerja	27
3.6.1 Penimbangan Hati.....	27
3.6.2 Pembuatan Homogenat Hati	27
3.6.3 Pemeriksaan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	27
3.6.4 Pemeriksaan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase	29
3.6.5 Pemeriksaan Aktivitas Spesifik Enzim GPT	29
3.6.6 Pemeriksaan Kadar MDA	30
3.6.7 Pemeriksaan Kadar Karbonil	33
3.6.8 Pengukuran Kadar Protein	34
3.7 Analisis Uji Statistik	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	35
4.2 Aktivitas spesifik enzim katalase pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	36
4.3 Aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	37
4.4 Kadar MDA hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	39
4.5 Kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	40

4.6	Kadar MDA dan karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	41
4.7	Aktivitas spesifik MnSOD dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	42
4.8	Aktivitas spesifik katalase dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	44
4.9	Aktivitas spesifik GPT dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	45
4.10.	Aktivitas spesifik MnSOD dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		50
5.1	Kesimpulan	50
5.2	Saran	51
DAFTAR PUSTAKA.....		52

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1 Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil	12
Gambar 2.2 Peran antioksidan endogen.....	14
Gambar 2.3 Situs aktif MnSOD.....	16
Gambar 2.4 Struktur katalase.....	17
Gambar 2.5 Struktur glutamat piruvat transaminasel	18
Gambar 2.6 Kerja enzim GPT	19
Gambar 2.7 Struktur mikroskopik jaringan hati	20
Gambar 4.1 Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	35
Gambar 4.2 Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	36
Gambar 4.3 Aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	37
Gambar 4.4 Kadar MDA pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	39
Gambar 4.5 Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap senyawa karbonil pada hati tikus.....	40
Gambar 4.6 Kadar MDA dan karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	41
Gambar 4.7 Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	42
Gambar 4.8 Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	42
Gambar 4.9 Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	44
Gambar 4.10. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	44
Gambar 4.11 Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	45

Gambar 4.12. Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik	46
Gambar 4.13. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.....	47

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 3.1 Komposisi reagen untuk pengukuran aktivitas MnSOD	28
Tabel 3.2 Cara kerja pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase	29
Tabel 3.3 Komposisi larutan standar untuk pengukuran kurva standar MDA ...	31
Tabel 3.4 Cara kerja pemeriksaan senyawa karbonil.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil pemeriksaan MnSOD.....	12
Lampiran 2 Hasil pemeriksaan katalase	14
Lampiran 3 Hasil pemeriksaan GPT.....	16
Lampiran 4 Hasil pemeriksaan MDA	17
Lampiran 5 Hasil pemeriksaan senyawa karbonil	18
Lampiran 6 Hasil pemeriksaan protein total.....	19

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

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 (superoksida, radikal hidroksil, alkoxyl, dan peroxyl) 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 tetap 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. Peroksida lipid merupakan hasil reaksi yang bersifat merugikan dalam tubuh. Peroksida lipid akan terurai menghasilkan sejumlah senyawa seperti epoksida, hidrokarbon dan aldehid. Di antara senyawa aldehid yang dihasilkan adalah Malondialdehid (MDA).⁷ Pada tingkat seluler, kerusakan protein dapat terjadi secara langsung oleh serangan radikal bebas atau tidak langsung melalui kerusakan sekunder akibat serangan produk peroksidasi lipid. Beberapa residu asam amino pada protein terutama histidin, lisin, arginin, prolin dan treonin, jika mengalami oksidasi akan membentuk senyawa karbonil yang dapat diukur setelah direaksikan dengan 2,4-dinitrophenylhidrazine.^{7,8}

Superoxide dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida (O_2^-) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Pada sel eukariotik terdapat tiga isoform SOD yaitu *copper-zinc superoxide dismutase* (Cu/ZnSOD), SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan *manganese superoxide dismutase* (MnSOD). MnSOD adalah enzim homotetramer yang mengikat satu ion Mn per subunit. MnSOD terdapat banyak pada mitokondria, oleh karena itu jumlahnya pada suatu jaringan tergantung banyak tidaknya mitokondria pada jaringan tersebut. Pada eritrosit mamalia dimana tidak terdapat mitokondria, tidak ditemukan MnSOD, sedangkan pada hati tikus aktivitas MnSOD merupakan 10% aktivitas total SOD. Aktivitas MnSOD berbeda pada berbagai macam organ dan dipengaruhi oleh beberapa keadaan misalnya hipoksia. Jumlah relatif MnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya. Penelitian yang dilakukan di laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 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.⁹ 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.¹⁰

Hati adalah organ metabolismik terbesar dan terpenting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama (karbohidrat, lemak, protein), detoksifikasi atau degradasi zat-zat sisa, sintesis berbagai protein plasma dan penyimpanan glikogen.¹¹ Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenous). 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 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam 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

Enzim glutamat piruvat transaminase (GPT) mengkatalisis reaksi perubahan asam amino alanin dan α -ketoglutarat menjadi piruvat dan glutamat. Enzim GPT banyak disintesis dan memiliki aktivitas paling tinggi di sel hati. Apabila terjadi kerusakan hati, akan terjadi gangguan sintesis enzim GPT, yang menyebabkan menurunnya aktivitas GPT di hati. Pada kerusakan hati enzim GPT akan dikeluarkan ke dalam darah sehingga kadar SGPT menjadi tinggi. Hal ini yang menyebabkan aktivitas enzim GPT pada darah, digunakan sebagai petanda terjadinya kerusakan hati.

Pada penelitian ini akan dianalisis aktivitas spesifik MnSOD, katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik dan hubungannya dengan stres oksidatif.

1.2. Pertanyaan Penelitian

1. Apakah terjadi perubahan aktivitas spesifik MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
2. Bagaimana hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
3. Apakah terjadi perubahan aktivitas spesifik katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
4. Bagaimana hubungan aktivitas spesifik katalase dan stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
5. Apakah terjadi perubahan aktivitas spesifik GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
6. Bagaimana hubungan aktivitas spesifik GPT dan stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?
7. Bagaimana hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Menganalisis aktivitas spesifik enzim MnSOD, katalase dan GPT pada sel hati tikus hipoksia sistemik kronik dan hubungannya dengan stres oksidatif.

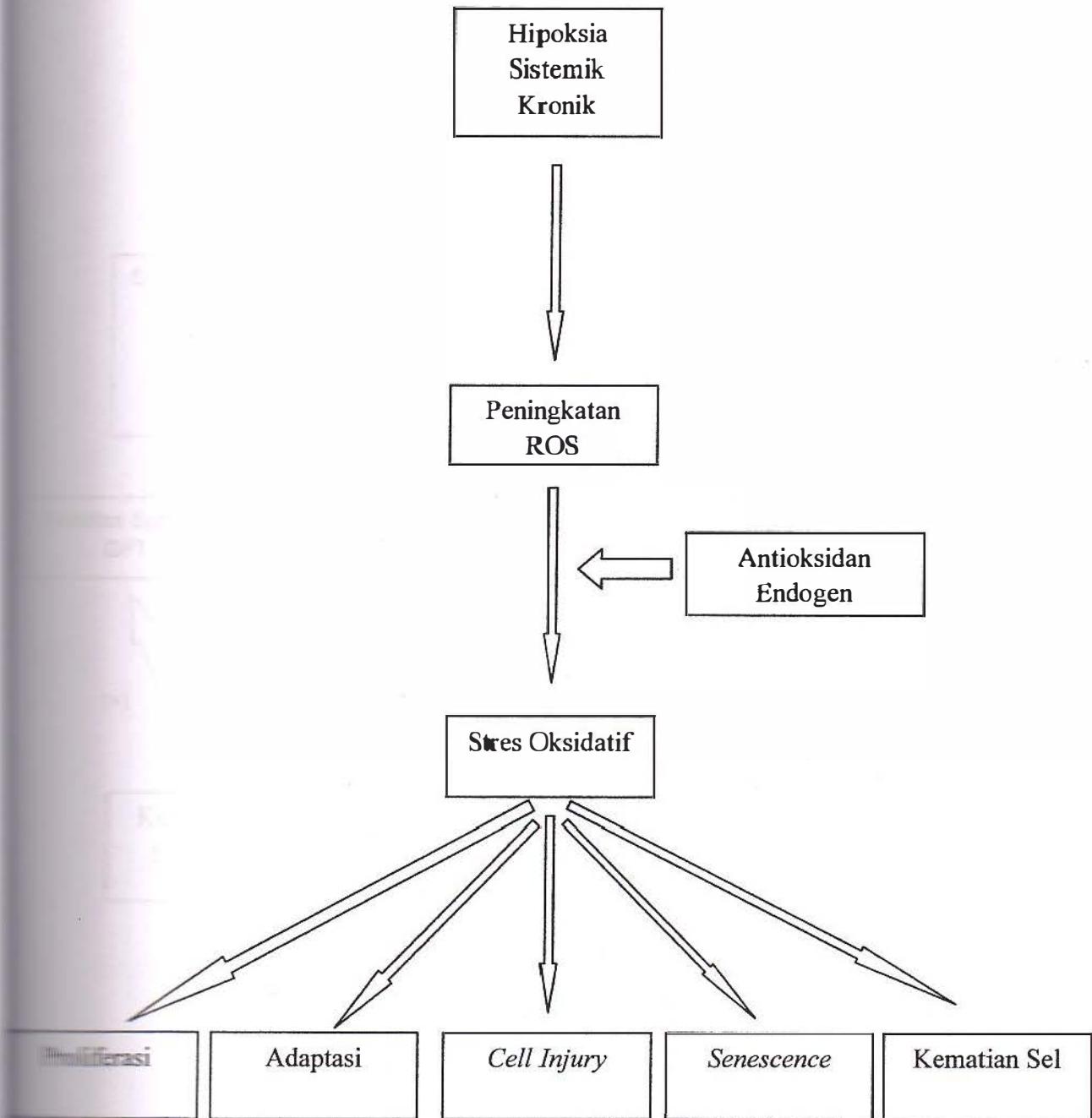
Tujuan khusus :

1. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
2. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
3. Menentukan aktivitas spesifik katalase dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
4. Menentukan aktivitas spesifik katalase dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
5. Menentukan aktivitas spesifik GPT dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
6. Menentukan aktivitas spesifik GPT dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
7. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan aktivitas spesifik katalase pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

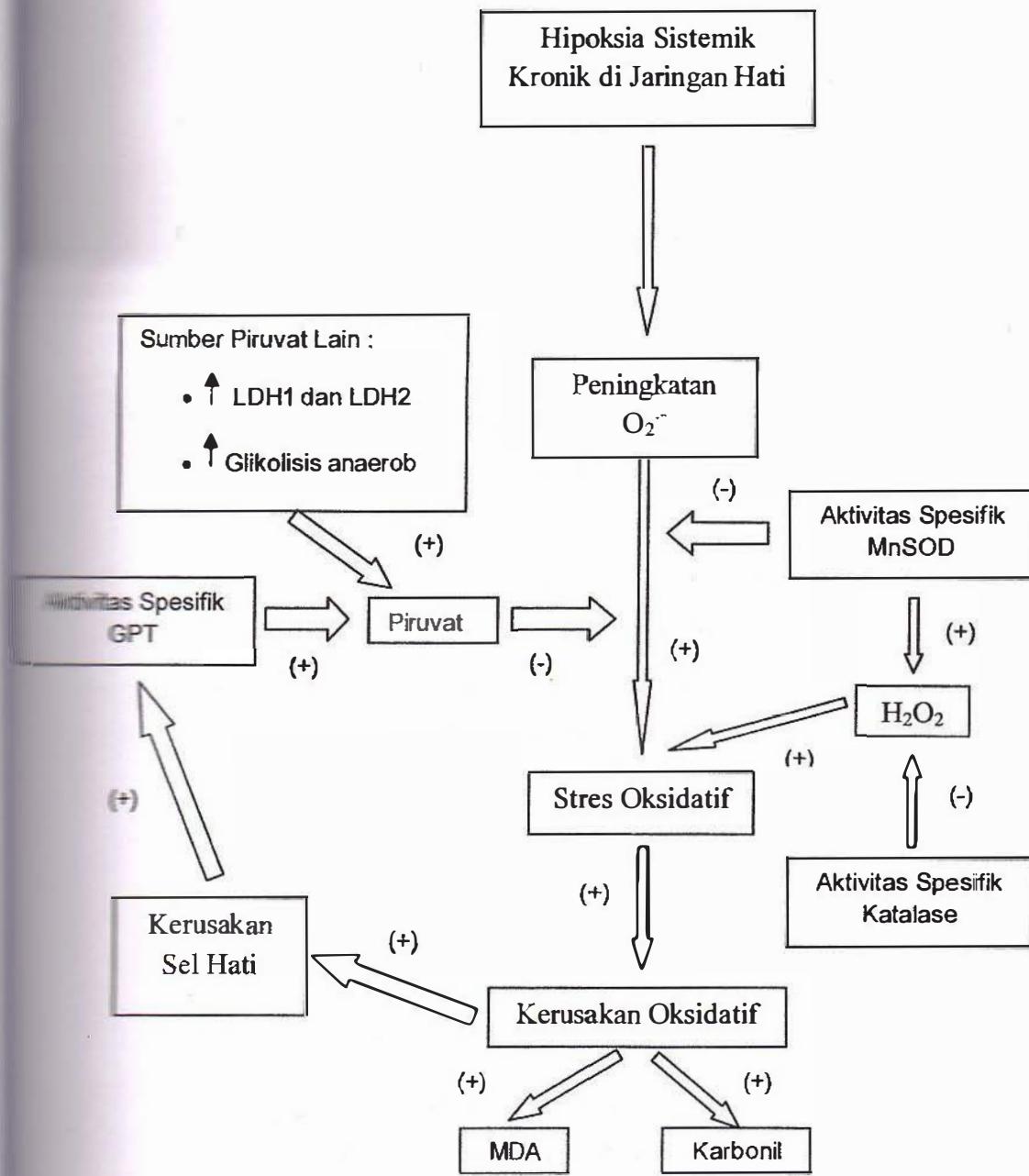
1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui peran aktivitas spesifik MnSOD dan katalase dalam mencegah terjadinya kerusakan oksidatif, serta mengetahui hubungan kerusakan oksidatif dan aktivitas spesifik GPT sebagai indikator kerusakan hati.

1.5. Kerangka Teori



I.6. Kerangka Konsep



Keterangan :

- Indikator yang akan diperiksa dalam penelitian ini dicetak dengan warna merah
- (+) = menghasilkan / meningkatkan
- (-) = menghambat / mengurangi
- ↑ = peningkatan

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hipoksia

Hipoksia adalah suatu keadaan dimana jumlah oksigen yang masuk tidak mencukupi untuk kebutuhan sel, jaringan atau organ sehingga mengganggu fungsi biologik.¹³ Hipoksia dapat menjadi cekaman lingkungan yang berat, yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel, jaringan atau organ yang bersangkutan. Kondisi hipoksia dapat terjadi selama keadaan fisiologik dan berbagai keadaan patofisiologik. Hipoksia dapat terjadi berupa hipoksia lokal atau sistemik. Hipoksia dapat disebabkan oleh berbagai faktor seperti (1) rendahnya tekanan parsial O₂ dalam darah arteri (hipoksia hipoksemik); (2) berkurangnya kapasitas hemoglobin dalam mengangkut O₂ akibat anemia (hipoksia anemik); (3) berkurangnya perfusi jaringan, baik umum maupun lokal (Hipoksia iskemik); (4) berkurangnya kemampuan jaringan menggunakan oksigen karena keracunan sel atau jaringan (hipoksia histotoksik atau sitotoksik) dan (5) gangguan difusi oksigen karena adanya aliran darah yang berlawanan dalam pembuluh kapiler (hipoksia difusi).¹⁴

Hipoksia dapat menyebabkan kapasitas kerja otot menjadi sangat menurun. Pada otot jantung akan menyebabkan curah jantung maksimal berkurang.¹¹ Tubuh sebenarnya memiliki mekanisme untuk mengatasi keadaan hipoksia. Agar dapat beradaptasi terhadap hipoksia, jaringan harus memiliki kemampuan untuk mengindera perubahan kadar O₂.¹⁵ Oksigenasi yang optimal ke seluruh sel tubuh akan dilakukan secara fisiologis guna mempertahankan homeostasis oksigen untuk kelangsungan hidupnya^{1,2} Pada keadaan hipoksia kronis akan terjadi peningkatan sel darah merah dan pembentukan pembuluh darah baru yang akan meningkatkan kapasitas pengangkutan oksigen oleh sel darah merah¹⁶

Respon seluler dan sistemik terhadap hipoksia dilakukan melalui peningkatan *hypoxia inducible factor-1α* (HIF-1α), suatu protein yang berperan mengatur respon seluler dan sistemik terhadap hipoksia. Pada keadaan oksigen

mencukupi, HIF-1 α akan terdegradasi. HIF-1 α akan mengalami ubiquitinilasi sebelum didegradasi oleh proteosome. Untuk terjadinya ubiquitinilasi sebelumnya diperlukan hidrosilasi residu prolin dari HIF-1 α oleh *prolyl hydroxylase*. Enzim *prolyl hydroxylase* membutuhkan oksigen sebagai kosubstrat untuk aktifitasnya.¹⁷ Pada keadaan hipoksia, dimana level oksigen sangat rendah, HIF-1 α menjadi stabil dan mengalami dimerisasi dengan HIF-1 β membentuk faktor transkripsi HIF-1. Faktor transkripsi HIF-1 akan terikat pada *hypoxia responsive element* (HREs) dalam promoter gen, yang akan menginisiasi terjadinya proses ekspresi gen-gen yang berperan untuk memberi respon terhadap terjadinya hipoksia. Beberapa ekspresi gen yang mengalami peningkatan pada keadaan hipoksia diantaranya ekspresi gen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *erythropoietin* (EPO).¹⁸

2.2. Stres Oksidatif

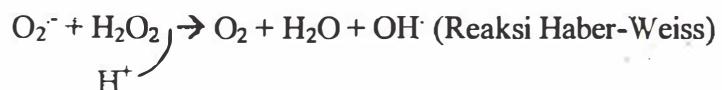
Stres oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas atau ROS yang lebih besar dari jumlah antioksidan yang ada. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan sel dan merupakan penyebab berbagai penyakit degeneratif.¹⁰

2.2.1. Radikal Bebas dan ROS

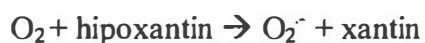
Radikal bebas merupakan suatu molekul atau atom yang orbit terluarnya memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan senyawa yang sangat reaktif. Radikal bebas dapat menyerang senyawa atau atom di dekatnya, sehingga senyawa tersebut dapat menjadi radikal bebas juga, yang dapat menyerang senyawa berikutnya, sehingga membentuk reaksi berantai. Beberapa radikal bebas yang penting dalam tubuh merupakan derivat nitrogen yang disebut *reactive nitrogen species* (RNS) dan derivat oksigen yang sering disebut ROS. ROS bisa terdapat dalam bentuk O₂⁻, radikal hidroksil (OH⁻), asam hipoklorit (HOCl), H₂O₂, radikal alkoksil dan radikal peroksil.¹⁹

Radikal bebas dapat berasal dari lingkungan luar (eksogen), antara lain dari pencemaran udara seperti pada industri pabrik, asap kendaraan bermotor dan asap rokok. Sekitar 90% pencemar udara merupakan

hidrokarbon, karbonmonoksida, nitrogen oksida, dan sulfur oksida yang akan mengakibatkan stres oksidatif dengan berbagai akibat buruk dalam tubuh. Pada tahun 1933 Fritz Haber dan Joseph Weiss pertama kali mengusulkan bahwa OH^- dihasilkan apabila O_2^- dan H_2O_2 direaksikan bersama-sama. Sebelumnya Henry Fenton juga mengobservasi bahwa pereduksi, ion ferro (Fe^{2+}) bersama H_2O_2 dapat mengoksidasi beberapa senyawa organik, mekanisme tersebut sekarang diketahui membentuk OH^- . Menurut definisi H_2O_2 tidak termasuk radikal bebas karena tidak mengandung elektron yang tidak berpasangan, namun secara biologis merupakan oksidan yang penting karena kemampuannya membentuk OH^- . Reaksi Fenton dan reaksi Haber Weiss secara singkat dapat ditulis sebagai berikut.



O_2^- dapat terbentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh ion metal dan xantin oksidase.¹⁹



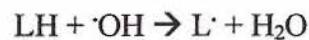
Dalam keadaan stres oksidatif pembentukan radikal bebas dalam tubuh berlebihan sehingga melampaui jumlah antioksidan yang terbentuk. Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif yaitu kerusakan berbagai makromolekul dalam sel. Kerusakan oksidatif akan berakibat dalam patogenesis berbagai penyakit degeneratif. Pada umumnya makromolekul seperti protein, karbohidrat dan lipid mudah mengalami kerusakan akibat radikal bebas. Sejumlah kecil ROS seperti O_2^- , H_2O_2 , dan HO^- , yang dihasilkan selama metabolisme aerobik normal, diketahui berperan sebagai molekul signal yang menginduksi berbagai

proses biologis, seperti stimulasi protein fosforilasi, Ca^{2+} signaling, hidrolisis fosfolipid, dan aktivasi faktor transkripsi.

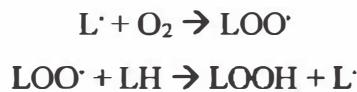
Stres oksidatif dapat mengakibatkan beberapa hal tergantung pada tipe sel dan tingkat keparahan dari stres oksidatif. Beberapa sel akan memberikan respon terhadap stres oksidatif ringan dengan cara berproliferasi. Sel yang lain dapat beradaptasi terhadap stres oksidatif yang terjadi melalui peningkatan regulasi sistem pertahanan. Stres oksidatif dapat menyebabkan *cell injury*, meliputi kerusakan terhadap beberapa atau semua target molekular, seperti lipid, DNA, protein, karbohidrat, dan lain-lain. Tidak semua kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif merupakan kerusakan oksidatif. Kerusakan sekunder terhadap biomakromolekul dapat dihasilkan dari stres oksidatif yang berhubungan dengan perubahan level ion. Sebagai contoh, peningkatan konsentrasi Ca^{2+} dapat memicu aktivasi proteinase. Stres oksidatif dapat juga dapat mengakibatkan *senescence*, yaitu suatu keadaan dimana sel dapat bertahan terhadap stres oksidatif yang terjadi tetapi sel tersebut tidak dapat membelah. Akibat terburuk dari stres oksidatif adalah kematian sel, kerusakan oksidatif yang terjadi pada DNA dapat memicu terjadinya apoptosis dan nekrosis sel.⁷

Stres oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan oksidasi *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), yaitu lipid yang memiliki dua atau lebih ikatan rangkap antara atom karbon (C=C).⁷ Peroksidasi lipid merupakan reaksi yang bersifat merugikan dalam tubuh. Senyawa lain yang juga merangsang pembentukan peroksida lipid adalah senyawa yang mengandung unsur Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, dan Sn.^{7, 8} Asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi MDA. MDA bila direaksikan dengan asam tiobarbiturat (TBA) akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 532 nm. Jumlah MDA yang terbentuk dapat menggambarkan proses peroksidasi lipid.

Tahap pertama dari proses peroksidasi lipid adalah inisiasi. Pada tahap ini, radikal bebas akan menginisiasi peroksidasi lipid. OH⁻ dapat menarik hidrogen dari PUFA (LH) sehingga dihasilkan radikal lipid (L[.]).



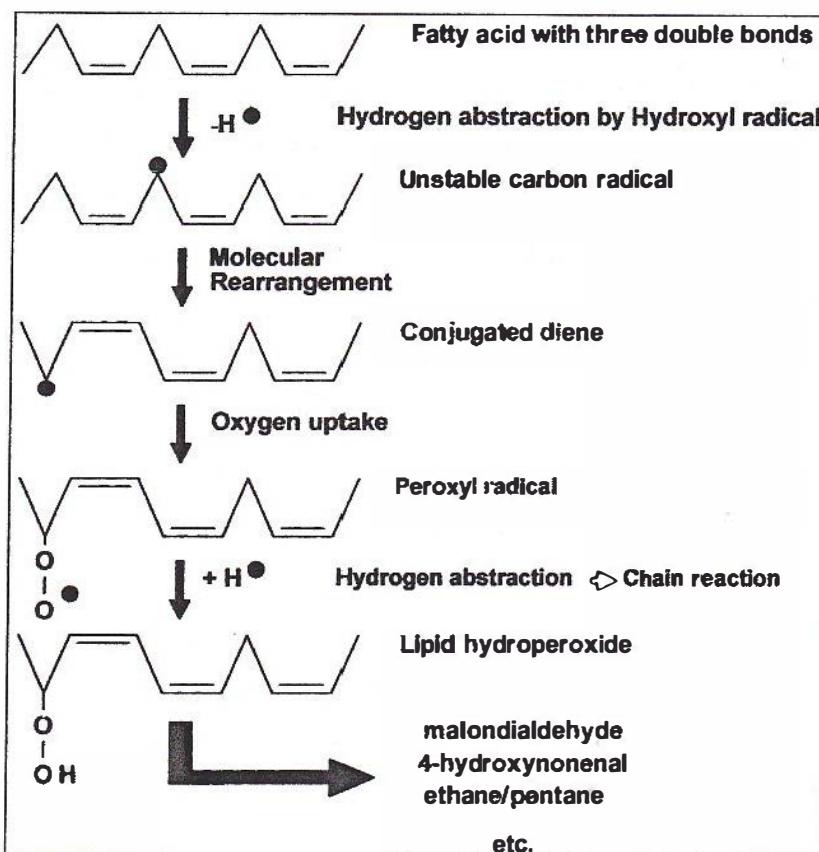
Tahap kedua dari proses peroksiadasi lipid adalah propagasi/pengembangan. Pada tahap propagasi terjadi dengan penambahan O₂ sehingga dihasilkan peroaksi lipid (LOO[.]). LOO[.] akan bereaksi dengan LH yang lain membentuk L[.] dan LOOH (peroksida lipid). Hal ini akan menyebabkan reaksi rantai peroksidasi lipid terus berlanjut.



Tahap berikutnya degradasi. Pada tahap degradasi LOOH akan terurai menjadi beberapa senyawa antara lain MDA, HNE, dan hidrokarbon. MDA bersifat larut dalam air dan terdapat dalam darah dan urin. MDA dibentuk dari asam lemak dengan 3 atau lebih ikatan rangkap dan pengukuran kadarnya dapat digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid.

Tahap terakhir dari proses peroksidasi lipid adalah terminasi. Pada tahap ini reaksi rantai peroksidasi lipid diakhiri dengan adanya reaksi antara satu radikal dengan radikal lainnya atau dengan adanya antioksidan.





Gambar 2.1. Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil.²⁰

Kerusakan protein dapat terjadi melalui serangan langsung radikal bebas atau kerusakan sekunder karena serangan produk akhir peroksidasi lipid, seperti isoketals, MDA, dan *4-Hydroxy-2-trans-nonenal* (HNE). Beberapa kerusakan protein bersifat reversibel, seperti inaktivasi peroksiredoksin, pembentukan metionin sulfoksida, S-nitrosilasi, perusakan Fe-S oleh O_2^- , glutationilasi, dan nitrasi. Selain itu, kerusakan protein dapat bersifat ireversibel, seperti yang terjadi pada oksidasi rantai samping asam-asam amino arginin, lisin, histidin, dan prolin menjadi residu karbonil.⁷

2.2.2. Antioksidan

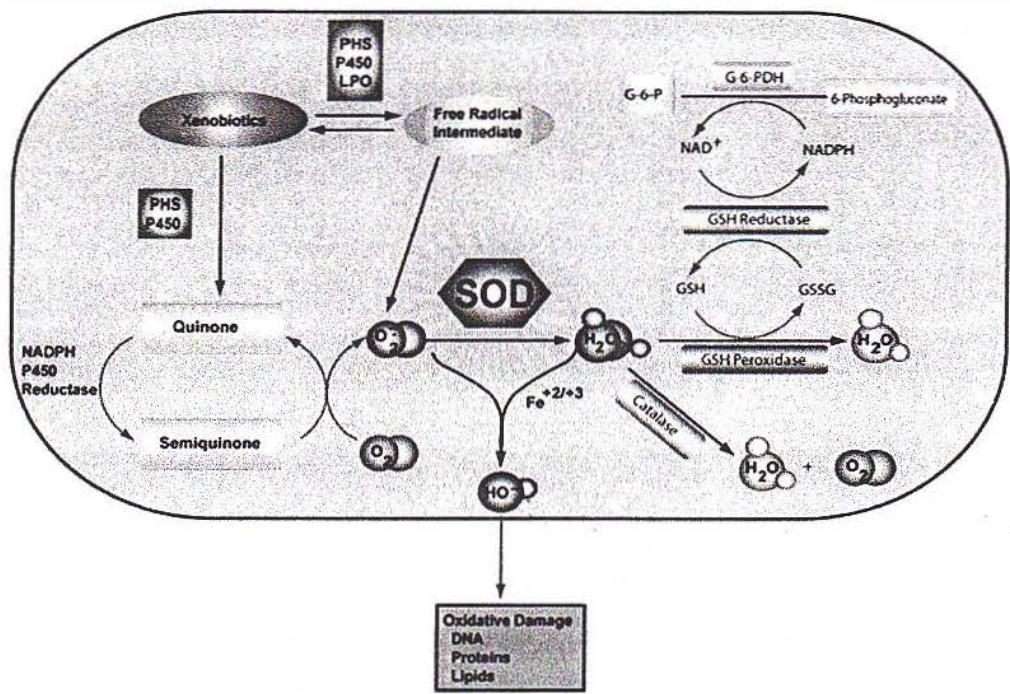
Antioksidan adalah istilah untuk senyawa-senyawa yang sangat mudah untuk dioksidasi, sehingga antioksidan dapat mencegah oksidasi dari senyawa yang dia lindungi. Antioksidan dapat berperan sebagai agen membuang radikal bebas secara katalitik, seperti SOD dan katalase. Peran antioksidan lainnya sebagai agen yang dapat mengurangi

pembentukan radikal bebas, seperti *mitochondria uncoupling protein*. salah satu yang termasuk dalam kategori ini adalah protein yang mengurangi availability terhadap prooksidan, contohnya adalah transferin, albumin, haptoglobin, haemopexin, haem oxygenases, metallothionein dan polyamines. Selain itu, juga terdapat protein yang mengoksidasi ion Fe²⁺, seperti ceruloplasmin. Sistem pertahanan antioksidan lain dapat berupa *sacrificial agent* yang secara utama dioksidasi oleh radikal bebas untuk menjaga biomolekul yang lebih penting, seperti glutation (GSH), α-tokoferol, bilirubin, askorbat, albumin, dan plasmalogen.¹⁰

Tingkat dan komposisi pertahanan antioksidan berbeda-beda antara jaringan yang satu dengan yang lainnya. Kerja antioksidan tergantung pada radikal bebas mana yang menjadi penyebab, bagaimana radikal bebas tersebut menyebabkan kerusakan, dimana radikal bebas tersebut bekerja, dan target dari kerusakan oleh radikal bebas.

Dalam meredam dampak negatif oksidan terdapat 2 kelompok antioksidan, yaitu antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus rantai. Antioksidan pencegah adalah antioksidan yang mencegah pembentukan OH, yaitu bekerja pada tahap inisiasi, contoh antioksidan pencegah adalah enzim katalase, SOD dan GSH. Antioksidan pemutus rantai adalah antioksidan yang bekerja mencegah reaksi rantai berlanjut dan bekerja pada tahap propagasi, contoh antioksidan pemutus rantai adalah vitamin E dan vitamin C.

Berdasarkan cara memperolehnya antioksidan dapat dibagi menjadi antioksidan endogen yang terdiri atas enzim-enzim dan berbagai senyawa yang disintesis tubuh, dan antioksidan eksogen yang diperoleh dari bahan makanan baik yang bersifat nutrien seperti vitamin maupun nonnutrien. SOD, katalase dan glutation peroksidase dikenal sebagai antioksidan enzimatik, yaitu enzim-enzim yang berperan sebagai baris pertama sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Enzim-enzim tersebut mengkatalisis perubahan senyawa oksigen reaktif menjadi senyawa yang kurang reaktif.²¹



Gambar 2.2. Peran antioksidan endogen.²²

O_2^- yang terbentuk pada rantai pernafasan akan dikonversi oleh SOD menjadi H_2O_2 . H_2O_2 kemudian akan dikonversi menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim katalase dan GSH. Apabila O_2^- berlebih, O_2^- akan bereaksi dengan H_2O_2 membentuk OH^- yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif.²²

2.3. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)

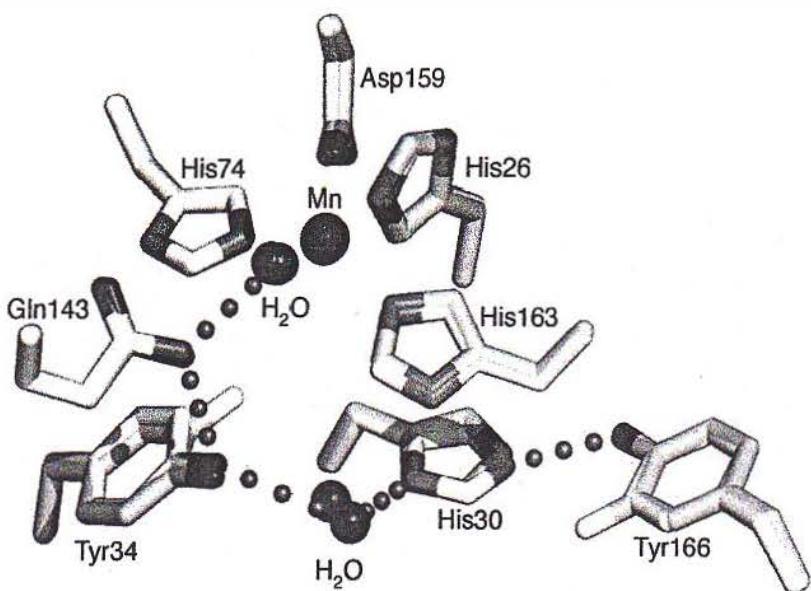
MnSOD adalah enzim antioksidan endogen yang terletak pada matriks mitokondria eukariotik. Pada metabolisme normal O_2^- diproduksi sebagai hasil dari rantai transfer elektron di mitokondria dan dapat menyebabkan kerusakan sel. MnSOD berperan untuk mengkonversi O_2^- yang terbentuk menjadi H_2O_2 dan O_2 . MnSOD merupakan salah satu enzim SOD yang berperan sebagai pertahanan primer terhadap stres oksidatif.²³

Bentuk isoform SOD yang lain yaitu Cu/ZnSOD (SOD1) dan ECSOD (SOD3). MnSOD banyak terdapat dalam mitokondria. Jumlah relatif dari MnSOD dan Cu/ZnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesies. Pada pertumbuhan medium yang normal, fungus *Dactylium dendroides*, 80% aktivitas SOD adalah sebagai Cu/ZnSOD dan 20% sebagai MnSOD. Namun, jika ketersediaan tembaga terbatas, maka MnSOD akan disintesis lebih banyak di sitosol untuk mempertahankan agar aktivitas seluler total tetap konstan. Diet

dapat mempengaruhi SOD pada hewan, misalnya pada penelitian hati ayam yang diberi diet Mn yang terbatas, memperlihatkan adanya peningkatan aktivitas Cu/ZnSOD dan penurunan MnSOD.¹⁰

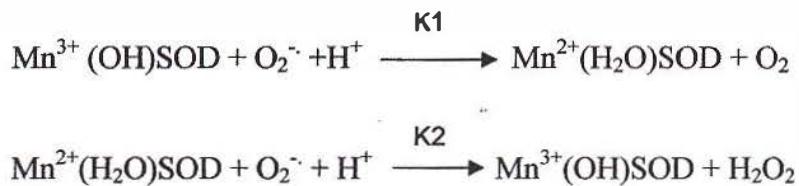
Gen MnSOD terletak di kromosom 6 (6q25.3) merupakan *single copy* yang terdiri dari 5 ekson dan 4 intron. Induksi dari gen ini dipengaruhi oleh karakteristik yang unik yakni promoter mengandung sedikit TATA dan memiliki elemen enhancer intron. Ekspresi gen diatur oleh promoter yang kaya sekuen guanin dan sitosin yang mengandung situs pengikatan protein spesifik 1 (PS1).^{24,25,26} Aktivitas MnSOD akan meningkat pada keadaan terbentuk O₂⁻ yang tinggi (*inducible enzyme*).²⁷

Berdasarkan studi struktural yang dilakukan oleh Borgstahl et al menyatakan bahwa MnSOD membentuk struktur geometri trigonal bipyramidal, sisi aktif terdiri dari 3 histidin, satu aspartat yang dikoordinasi oleh ion mangan. Pada situs aktif terdapat juga ikatan hidrogen antara beberapa asam amino dengan air, ikatan hidrogen ini dimulai dari ion mangan yang berikatan dengan air, lalu berikatan Gln 143 ke Tyr 34, melalui pelarut ke HIS 30, dan akhirnya ke Tyr 166. Ikatan hidrogen ini berguna untuk membantu transfer proton ke situs katalitik dalam proses katalisis. Subtitusi atau mutasi pada asam amino yang membentuk ikatan hidrogen akan mempengaruhi aktivitas enzimatik MnSOD. Penghilangan, pergantian dan pemindahan ion mangan akan menghilangkan aktivitas katalitiknya.²⁸ Ion mangan tidak dapat digantikan dengan besi atau ion metal lainnya untuk menghasilkan enzim fungsional.¹⁰



Gambar 2.3 Situs aktif MnSOD.²⁹

MnSOD merupakan enzim protektif primer terhadap stres oksidatif yang terdapat dalam mitokondria yang penting untuk kelangsungan hidup aerobik. MnSOD menetralisir O_2^- melalui dua tahap reaksi, yaitu reaksi reduksi Mn^{3+} dan oksidasi kembali Mn^{3+} .³⁰



Perubahan pada aktivitas MnSOD akan menyebabkan perubahan status redoks dari sel, dan dapat mempengaruhi ekspresi gen HIF-1 α .

2.4. Katalase.¹⁰

Struktur enzim katalase tetramer. Setiap tetramernya terdiri dari beberapa subunit yang identik. Setiap subunit mengandung gugus heme (Fe^{3+}) dipusat katalitiknya. Ion Fe^{3+} ini berperan dalam katalisis pemecahan H_2O_2 . Pemindahan ion Fe^{3+} dari akan membuat katalase kehilangan aktivitas katalitiknya. Struktur katalase bersifat sangat stabil. Enzim ini lebih resisten terhadap pH, denaturasi terminal, dan proteolisis disbanding enzim-enzim lain.



Gambar 2.4. Struktur katalase.³¹

Katalase merupakan salah satu enzim yang dapat mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Reaksi penguraian H_2O_2 terjadi melalui mekanisme katalitik dan peroksidatik. Mekanisme katalitik terjadi bila katalase menggunakan molekul H_2O_2 sebagai substrat atau donor elektron dan molekul H_2O_2 yang lain sebagai oksidan atau akseptor elektron. Mekanisme peroksidatik terjadi bila katalase menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai akseptor elektron dan senyawa lain sebagai donor elektron. Senyawa yang dapat berperan sebagai donor elektron antara lain metanol, etanol, asam formiat, dan ion nitrit. Senyawa donor elektron yang berupa metanol dan etanol akan dioksidasi menjadi formaldehid dan asetaldehid, sedangkan asam formiat akan dioksidasi menjadi karbondioksida dan ion nitrit dioksidasi menjadi nitrat.

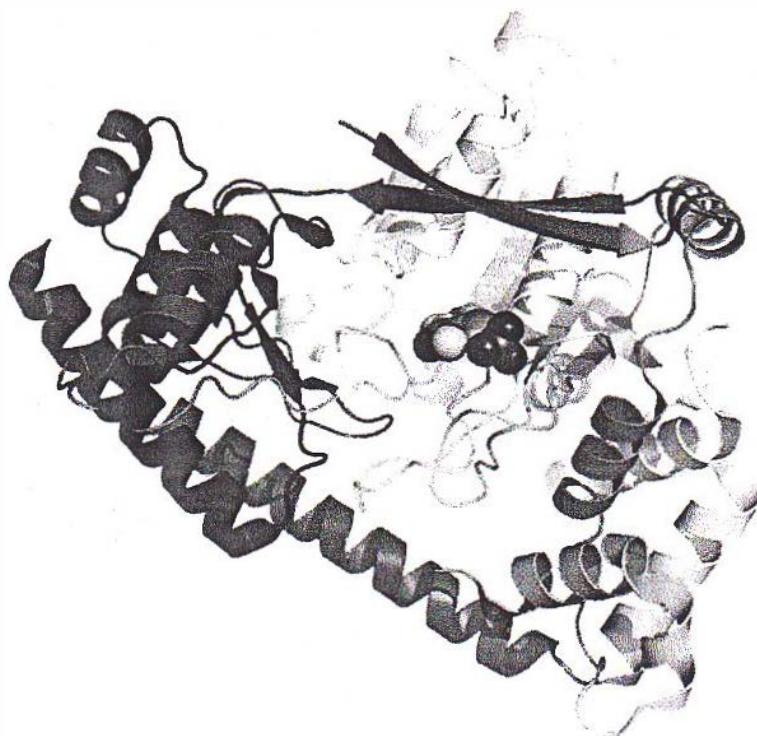
Pada hewan katalase terdapat pada semua organ, tetapi secara khusus terdapat di hati. Katalase dalam eritrosit membantu proteksi eritrosit terhadap H_2O_2 yang dihasilkan melalui dismutasi $O_2^{..}$ dari autooksidan hemoglobin. Jika H_2O_2 melintasi membran, katalase yang terdapat pada eritrosit dapat melindungi jaringan lain terhadap H_2O_2 ekstraselular dengan cara mengabsorbsi dan

merusaknya. Otak, jantung, dan otot rangka memiliki level katalase yang rendah, meskipun aktivitasnya bervariasi antara tipe sel yang satu dengan lainnya.

Aktivitas katalase dapat dihambat oleh azida, sianida, asam hipoklorit dan aminotriazol. Aktivitas katalase terutama ditemukan pada peroksisom sedangkan pada mitokondria, kloroplas, dan retikulum endoplasma aktivitas katalase rendah. Aktivitas maksimum katalase didapat pada pH 7, namun katalase dapat bekerja pada pH 4-8,5. Pada pH dibawah 4 atau diatas 8,5 terjadi inaktivasi enzim.

2.5. Enzim Glutamat Piruvat Transaminase (GPT)

GPT banyak ditemukan dalam sitosol sel hati. Enzim ini memiliki dua *isoform*, yang masing-masing dikode oleh gen yang berbeda. ALT1 terutama terdapat pada hati, intestinal, ginjal, dan jantung. ALT2 terutama terdapat pada hati, otot, otak, ginjal dan hati. Enzim ini memiliki peran penting dalam proses glukoneogenesis dan metabolisme asam amino.³²



Gambar 2.5. Struktur glutamat piruvat transaminase.³²

Glutamat piruvat transaminase atau alanin transferase dapat mengkatalisis reaksi pemindahan gugus amino ($-\text{NH}_2$) dari asam amino alanin ke asam amino α -ketoglutarat menghasilkan asam piruvat dan glutamat.



Gambar 2.6. Kerja enzim GPT.³³

Aktivitas GPT tertinggi pada hati, jadi lebih spesifik untuk penyakit hati dibandingkan dengan enzim lain. Biasanya peningkatan GPT terjadi bila ada kerusakan pada membran sel hati. Setiap jenis peradangan hati dapat menyebabkan peningkatan pada GPT. Peradangan pada hati dapat disebabkan oleh hepatitis virus, beberapa obat, penggunaan alkohol, dan penyakit pada saluran cairan empedu.

Piruvat sebagai produk dari GPT. Beberapa penelitian menyebutkan peran piruvat dalam pertahanan terhadap stres oksidatif yang terjadi. Piruvat dapat berperan sebagai “antioksidan” dengan menghambat kerja NADH oksidase. Seperti diketahui sebelumnya NADH oksidase adalah sumber utama dari terbentuknya O_2^- . Akibat penghambatan pembentukan O_2^- oleh piruvat, maka akan terjadi penghambatan pada proses peroksidasi lipid dan pembentukan senyawa karbonil. Penelitian yang dilakukan Roudier dkk melaporkan bahwa piruvat dapat mengurangi kerusakan DNA selama terjadinya hipoksia pada karsinoma sel hati.³⁴ Lee dkk melaporkan dalam penelitiannya bahwa etil piruvat, suatu senyawa piruvat yang mengalami modifikasi agar lebih stabil dalam larutan, secara bermakna dapat menurunkan kadar MDA dan senyawa NO yang terbentuk pada jantung dan hati tikus yang diintoksikasi dengan paraquat.³⁵

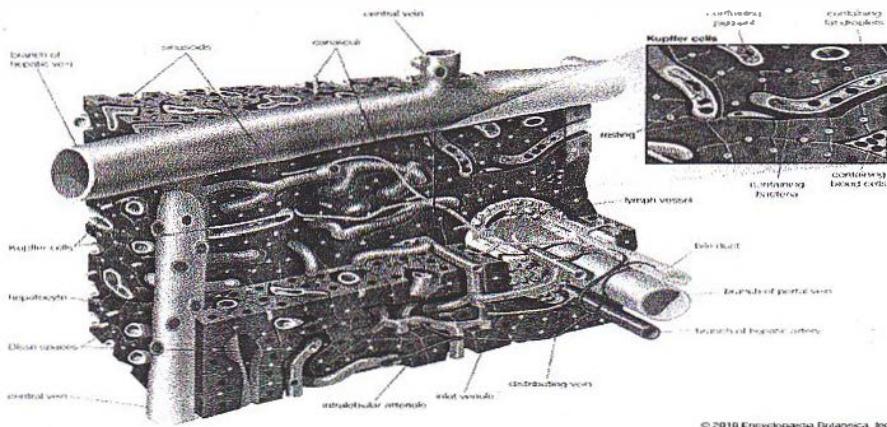
2.6. Hati.³⁶

Hati adalah organ tempat nutrien yang diserap dari saluran cerna diolah dan disimpan untuk dipakai oleh bagian tubuh lain. Ia menjadi perantara antara sistem pencernaan dan darah. Disamping kulit, hati adalah organ tubuh terbesar dan merupakan kelenjar terbesar, dengan berat lebih kurang 1,5 kg. Hati terletak di

rongga perut dibawah diafragma. 70-80% darah yang masuk ke hati berasal dari vena porta, sebagian kecil dipasok oleh arteri hepatica. Seluruh zat yang diserap melalui usus tiba di hati melalui vena porta, kecuali lipid kompleks (kilomikron), yang terutama diangkut melalui pembuluh limfe. Posisi hati dalam sistem sirkulasi adalah optimal untuk menampung, mengubah dan mengumpulkan metabolit serta untuk menetralisasi dan mengeluarkan substansi toksik. Pengeluaran ini terjadi melalui empedu, suatu sekret eksokrin dari hati yang penting untuk pencernaan lipid.

2.6.1. Struktur Hati.³⁶

Jaringan hati terbagi-bagi menjadi lobulus-lobulus berbentuk heksagonal berdiameter 1-2 mm yang berpusat pada vena hepatica terminalis. Traktus portalis yang berisi a.hepatika, v.porta dan duktus biliaris terletak pada bagian perifer lobulus. Hepatosit yang berada disekitar v.hepatika terminalis disebut sebagai hepatosit sentrilobuler, sedangkan yang berada dekat traktus portalis disebut sebagai hepatosit periportal.



Gambar 2.7. Struktur mikroskopik jaringan hati.³⁷

2.6.1.1. Stroma

Hati dibungkus oleh simpai tipis jaringan ikat (kapsula glisson) yang menebal di hilum, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hati dan duktus hepaticus kiri dan kanan serta tempat keluarnya pembuluh limfe. Pembuluh-pembuluh dan duktus ini dikelilingi oleh jaringan ikat sepanjang jalannya (akhir atau awal) di daerah portal di antara lobulus hati klasik. Pada titik ini jalinan serat

retikular halus terbentuk yang menujung hepatosit dan sel endotel sinusoid dari lobulus hati.

2.6.1.2. Lobulus Hati

Komponen struktural utama dari hati ialah sel batি atau hepatosit, sel epitelial ini berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan. Pada sajian mikroskop cahaya, tampak adanya satuan-satuan struktural yang disebut lobulus hati klasik. Lobulus hati dibentuk oleh massa jaringan berbentuk poligonal berukuran $0,7 \times 2$ mm. Pada manusia lobulus ini saling berkontak sehingga sulit sukar ditetapkan batas-batas antar lobuli. Tetapi pada beberapa daerah lobulus ini dibatasi oleh jaringan ikat yang mengandung duktus biliaris, pembuluh limfe, saraf, dan pembuluh darah. Daerah ini disebut celah portal, terdapat pada sudut lobulus dan dihuni oleh triad portal. Hati manusia memiliki 3-6 triad portal per lobulus, masing-masing mengandung sebuah venul (cabang vena porta), sebuah arteriol (cabang arteri hepatica), satu duktus (bagian dari sistem duktus biliaris) dan pembuluh limfe. Venul biasanya paling besar diantara semuanya, mengandung darah asal vena mesenterika superior dan inferior dan vena lienalis. Arteriol mengandung darah dari trunkus seliakus dan aorta abdominalis. Duktus, yang dilapisi epitel kuboid, membawa empedu dari sel parenkim (hepatosit) dan akhirnya dicurahkan kedalam duktus hepaticus. Satu atau lebih pembuluh limfe membawa cairan limfe, yang akhirnya masuk kedalam aliran darah. Semua struktur tadi terpendam dalam selubung jaringan ikat.

Hepatosit berderet secara radier dalam lobulus hati. Mereka membentuk lapisan setebal 1-2 sel, mirip susunan bata pada dinding. Lempeng sel ini mengarah dari tepian lobulus kepusatnya dan beranastomosis secara bebas, membentuk struktur mirip labirin dan busa. Celah diantara lempeng-lempeng ini mengandung kapiler yang disebut sinusoid hati, sinusoid adalah pembuluh yang melebar secara tidak teratur, terdiri atas sel-sel endotel berajar membentuk lapisan tidak utuh. Sel-sel endotel dipisahkan dari hepatosit dibawahnya oleh celah subendotelial yang dikenal sebagai celah Disse, yang mengandung mikrovilli dari hepatosit. Akibatnya cairan darah dengan mudah mengalir dan menapis melalui dinding endotel dan berkontak langsung dengan permukaan

hepatosit, memungkinkan pertukaran makromolekul dengan mudah dari lumen sinusoid ke sel hati dan sebaliknya. Hal ini secara fisiologis penting bukan hanya karena banyaknya makromolekul yang dicurahkan kedalam darah oleh hepatosit, tetapi juga karena hati mengambil dan mengkatabolisasi banyak diantara molekul besar ini.

2.6.2. Aliran darah hati

Hati memperoleh darah dari dua sumber, 80% aliran darahnya berasal dari vena porta yang mengangkut darah rendah oksigen, kaya nutrien dari visera abdominal dan 20% sisanya berasal dari arteria hepatica yang memasok darah kaya oksigen. Vena porta sering kali bercabang dan menjulurkan venul halus, vena porta kadang-kadang disebut cabang interlobular, bercabang menjadi vena distribusi yang berjalan di tepian lobulus. Dari vena distribusi, venul halus mencurahkan isinya ke dalam sinusoid. Sinusoid berjalan radier, menuju ke pusat lobulus membentuk vena sentralis, atau sentrolobuler. Selama berjalan didalam lobulus, vena ini makin banyak mengandung sinusoid dan secara berangsur makin besar diameternya. Pada ujungnya ia meninggalkan lobulus pada basisnya dan menyatu dengan vena sublobularis yang lebih besar. Kemudian beberapa vena sublobularis bergabung membentuk dua atau lebih vena hepatica besar, yang mencurahkan isinya kedalam vena kava inferior.

Sistem porta membawa darah dari pankreas dan limpa serta darah yang mengandung nutrien hasil penyerapan pada usus. Nutrien dikumpulkan dan di transformasi dalam hati. Bahan-bahan toksik juga dinetralisir dan dibuang dalam hati. Arteri hepatica bercabang berulang kali dan menghasilkan arteri interlobular. Beberapa memperdarahi struktur dari kanal portal dan lainnya dari arteriol yang berakhir langsung kedalam sinusoid pada jarak yang berbeda dari celah portal, sehingga dengan demikian menyediakan darah arterial dan darah portal bagi sinusoid. Fungsi utama dari sistem arteri adalah menyalurkan oksigen dalam jumlah yang cukup ke sel hati.³⁶

Berdasarkan kedekatan sel-sel parenkim dan pembuluh darah (vena distribusi), maka sel-sel tersebut dapat dibagi menjadi 3 zona. Sel-sel pada zona satu menempati daerah yang paling dekat dengan suplai vaskuler dari traktus

portalis, sehingga sel-sel ini yang pertama dipengaruhi oleh perubahan darah yang masuk. Zona 3 terletak disekeliling v.hepatika dan zona dua diantaranya. 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 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam 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

2.6.3. Fungsi Hati.³⁶

Sel hati merupakan sel yang paling serba guna dalam tubuh. Pada saat yang sama sel hati dapat berfungsi endokrin dan eksokrin, membentuk dan mengumpulkan substansi tertentu, mendetoksifikasi suatu substansi serta mentransfer substansi lain. Beberapa fungsi hati antara lain :

a. Sintesis protein plasma

Selain membuat protein untuk selnya sendiri, sel hati menghasilkan berbagai protein plasma seperti albumin, protrombin, fibrinogen dan lipoprotein. Protein ini dibuat pada polisom yang melekat pada retikulum endoplasma kasar.

b. Sekresi empedu

Produksi empedu adalah fungsi eksokrin dalam arti bahwa hepatosit meningkatkan pemasukan, transformasi dan ekskresi komponen darah kedalam kanalikuli biliaris. Empedu memiliki beberapa komponen penting seperti asam empedu, fosfolipid, kolesterol dan bilirubin.

c. Penyimpanan Metabolit

Lipid dan karbohidrat disimpan dalam hati dalam bentuk trigliserida dan glikogen.

d. Fungsi metabolismik

Hepatosit berfungsi mengkonversi lipid dan asam amino menjadi glukosa melalui proses glukoneogenesis, hepatosit juga menjadi tempat utama terjadinya deaminasi dari asam amino menghasilkan urea. Senyawa ini diangkut dalam darah ke ginjal dan diekskresi oleh organ itu.

e. Detoksifikasi dan inaktivasi

Berbagai obat dan substansi dapat dinonaktifkan oleh oksidasi, metilasi, atau konjugasi. Enzim yang berperan dalam proses ini terutama terdapat dalam retikulum endoplasma halus sel hati.

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dilakukan di bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, sampel penelitian yang dipakai dalam penelitian besar ini adalah tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L*), berumur 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus diperoleh dari Unit Gizi Diponegoro Litbang Depkes RI. Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi 5 kelompok :

- I. Kelompok tikus kondisi normal sebagai kontrol
- II. Kelompok tikus dengan hipoksia selama 1 hari
- III. Kelompok tikus dengan hipoksia selama 7 hari
- IV. Kelompok tikus dengan hipoksia selama 14 hari
- V. Kelompok tikus dengan hipoksia selama 21 hari

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.³⁸

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hati tikus jantan strain Sprague Dawley.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Biokima dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung selama 5 bulan, mulai bulan Januari 2010 sampai Mei 2010.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah jaringan hati tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L*), yang berasal dari penelitian sebelumnya.

Dua puluh lima hati tikus ini dibagi menjadi 5 kelompok :

- I. Kelompok hati tikus kondisi normal sebagai kontrol
- II. Kelompok hati tikus dengan hipoksia selama 1 hari

- III. Kelompok hati tikus dengan hipoksia selama 7 hari
- IV. Kelompok hati tikus dengan hipoksia selama 14 hari
- V. Kelompok hati tikus dengan hipoksia selama 21 hari

3.4. Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel penelitian ditentukan berdasarkan rumus Federer:

$$\begin{array}{ll} \{(t-1)(n-1)\} \geq 1 & t = \text{jumlah kelompok perlakuan} = 5 \\ \{(5-1)(n-1)\} \geq 15 & n = \text{jumlah sampel pada masing-masing kelompok} \\ n \geq 5 & \text{perlakuan} \end{array}$$

Jadi masing-masing kelompok terdiri dari 5 jaringan hati tikus. Jumlah sampel total adalah 25 jaringan hati tikus.

3.5. Bahan dan Alat Penelitian

3.5.1. Bahan Penelitian

- Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD : Kit RanSOD® (Randox).
- Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas spesifik GPT : Kit GPTST (ST Reagensia).
- Standar MDA , TCA (*trichloro acetic acid*) , TBA (*tiobarbituric acid*)
- H₂O₂
- Guanidin, DNPH, HCL, etanol, etil asetat
- NaCN (Natrium Sianida)
- *Nuclei lysis solution*
- PMSF (*Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride*)
- Aquabidest
- PBS (*Phosphat Buffer Saline*)
- Buffer fosfat

3.5.2. Alat Penelitian

- Timbangan digital
- Ultra-low temperature freezer -80°C (MDF-U3286S, Sanyo)

- Gunting dan pinset
- Homogenizer (Wheaton Science, Millville, NJ-USA)
- mikropestle
- Spektrofotometer
- Sentrifus, vorteks, water bath
- Tabung mikro, mikropipet dan tip
- Lemari es 4 °C

3.6. Cara Kerja

3.6.1. Penimbangan Hati

Pada pembuatan homogenat hati yang akan dipergunakan untuk pemeriksaan MDA, senyawa karbonil, GPT dan katalase, jaringan hati ditimbang dengan berat \pm 100 mg, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD berat jaringan hati yang ditimbang \pm 50 mg.

3.6.2. Pembuatan Homogenat hati

Untuk pemeriksaan MDA, senyawa karbonil, GPT dan katalase, jaringan hati dilumatkan dengan *mikropestle* dan *homogenizer* dalam 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7.0 dan PMSF, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD, jaringan hati dilumatkan dengan menggunakan *mikropestle* dan *homogenizer* dalam 50 μ l *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.

3.6.3. Pemeriksaan aktifitas spesifik enzim MnSOD

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD digunakan homogenat jaringan hati (50 mg), jaringan kemudian dilumatkan dalam 500 μ L *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 aktivitas MnSOD. Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia yaitu dengan menggunakan kit RanSOD®. Prinsip pemeriksaan MnSOD dengan menggunakan kit ini adalah pengukuran besarnya inhibisi pembentukan radikal O_2^- oleh MnSOD. Xantin oleh enzim xantin oksidase akan diubah menjadi asam urat dan

menghasilkan radikal superoksida. Radikal ini akan bereaksi dengan 2-(4-*iodophenyl*)-2-(4-*nitrophenol*)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T) membentuk wama merah formazan. Aktivitas SOD total ditetapkan dari derajat penghambatan pembentukan wama formazan ini yang diukur dengan spektrofotometer λ 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 25 μ L sampel/standar dimasukan ke dalam kuvet, lalu ditambahkan *mixed substrate* dan campur dengan baik. Untuk menghambat Cu/ZnSOD, sebanyak 5 μ L 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 (A_1) dan 3 menit kemudian (A_2).

Tabel 3.1. Komposisi reagen untuk pengukuran aktivitas MnSOD dengan kit RanSOD®

Reagen	Sampel Diluent (S1)	Standar S2-S6	Sampel
Sampel	-	-	25 μ L
Standar	-	25 μ L	-
Buffer fosfat	25 μ L	-	-
Mixed Substrate	850μL	850μL	850μL
Campur baik-baik			
NaCN 5 mM	-	-	5 μ L (inkubasi 5 menit)
Xantin oksidase	125 μ L	125 μ L	125 μ L
Baca absorbansi pada λ 505 nm 30 detik pertama dan 3 menit kemudian			

Perhitungan

$$A_2 - A_1$$

$$\frac{\Delta A}{3} = \Delta A/\text{menit (sampel maupun standar)}$$

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

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{100 - (\Delta A \text{ std}/\text{mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ SI}/\text{mnt})}$$

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ sampel}/\text{mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ SI}/\text{mnt})}$$

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

3.6.4. Pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase

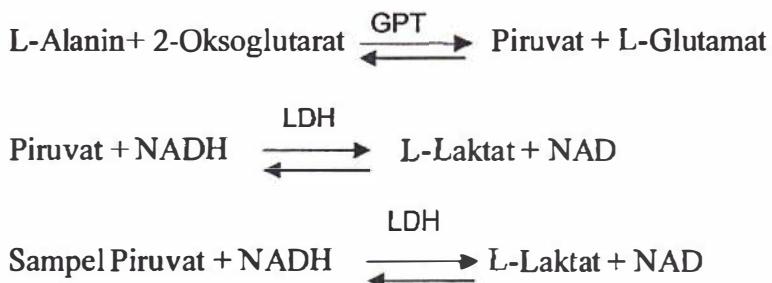
Pemeriksaan aktivitas katalase dilakukan dengan menggunakan metode Mates. Optimasi dilakukan terlebih dahulu sebelum pemeriksaan sampel. Dari hasil optimasi pengenceran sampel optimum adalah 500X, dan waktu optimum adalah pada saat menit ke 2. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 210 nm, setelah blangko atau sampel uji dicampur dengan H₂O₂ reaksi akan berjalan, t₀ adalah 30 detik setelah pencampuran, t₁ adalah 1 menit setelah t₀, dan seterusnya.

Tabel 3.2. Cara kerja pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase

Kuvet	Blanko	Uji
Sampel	-	50μL
Dapar fosfat	50μL	-
H ₂ O ₂ (1: 4000)	950μL	950μL
Reaksi berjalan setelah penambahan H ₂ O ₂ pada tabung uji dan Blangko, serapan diikuti selama 10 menit dan dicatat serapannya pada panjang gelombang 210 nm setiap 1 menit		

3.6.5. Pemeriksaan aktivitas spesifik enzim GPT

Aktivitas enzim GPT ditentukan secara biokimia dengan menggunakan kit GPTST. Prinsip pemeriksaan GPT dengan kit ini berdasarkan metode yang dianjurkan oleh IFCC dari metode yang dikemukakan oleh Wroblewski dan Ladue dan dimodifikasi oleh Henry dan Bergmeyer.³⁹



Reagen-reagen pada kit ini terdiri dari substrat dan buffer, sebanyak 20 mL buffer ditambahkan kedalam botol substrat, kemudian campur dengan baik. Dalam pemeriksaan GPT ini sampel diencerkan 2X. Kedalam kuvet ditambahkan 60 μL sampel yang telah diencerkan dan 600 μL substrat kemudian campur dengan baik dan setelah 30 detik dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm,kemudian pengukuran diulang setiap 10 detik berikutnya sampai 3x.

Perhitungan

$$\Delta A/\text{menit} = \frac{\frac{(\Delta A_1 - \Delta A_2) + (\Delta A_2 - \Delta A_3)}{10}}{2}$$

$$\text{Aktifitas GPT IU/L} = (\Delta A/\text{menit} \times 1746)$$

*1746 adalah faktor konversi panjang gelombang 340nm, sesuai petunjuk dari kit.

3.6.6. Pemeriksaan kadar MDA

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan TCA pada suhu 97°C akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang akan memberikan serapan pada panjang gelombang 530 nm. Jumlah MDA yang terbentuk akan menggambarkan proses peroksidasi lipid.

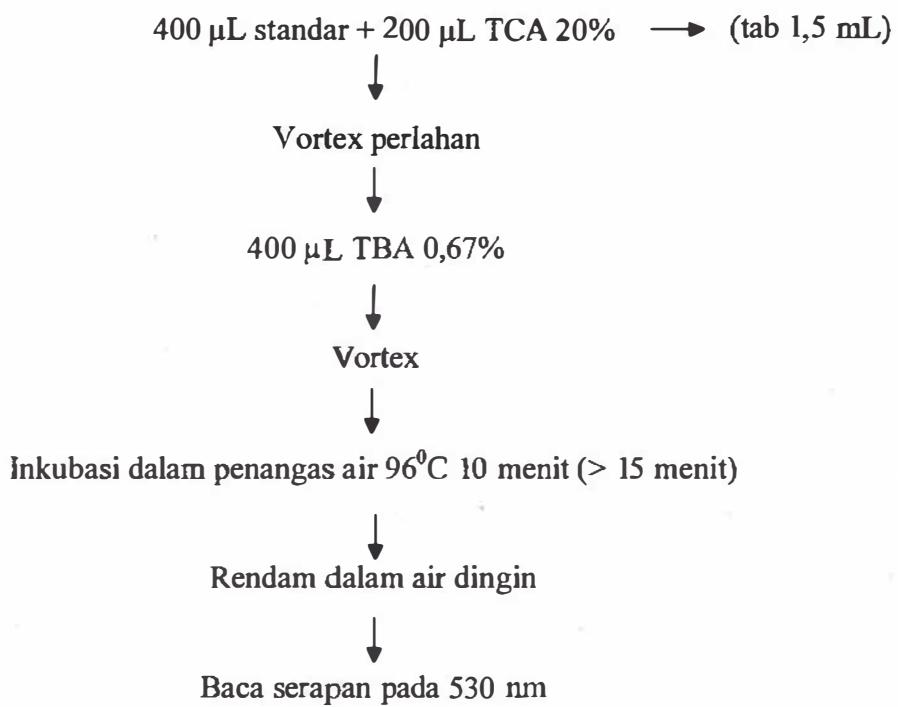
Pembuatan Kurva Standar MDA

Kurva standar dibuat dengan larutan standar MDA yaitu *tetra ethoxy propane* (TEP) sebagai prekusor. TEP ini akan dihidrolisis oleh air menjadi

MDA. Pembuatan kurva standar dengan menggunakan berbagai konsentrasi larutan standar TEP.

Tabel 3.3. Komposisi larutan standar untuk pengukuran kurva standar MDA

	Blanko	[0,125]	[0,3125]	[0,625]	[1,25]	[2,5]	[5]
Std	0	1	2,5	5	10	20	40
H ₂ O (μL)	400	399	397,5	395	390	380	360
Total (μL)	400	400	400	400	400	400	400



Pengukuran Sampel

Sampel : diencerkan 4X (100 μ L sampel + 300 μ L H₂O)

400 μ L sampel (pengenceran 4X) \rightarrow tab 1,5 mL

↓
+200 μ L TCA 20%

Vortex sentrifus 5000 rpm, 10 menit

Ambil supernatan (= terbentuk endapan) \rightarrow tab 1,5 mL

↓
+400 μ L TBA 0,67%

Vortex

Inkubasi dalam penangas air 96°C, 10 menit

Rendam dalam air dingin

↓
Baca serapan pada 530 nm

Perhitungan kadar MDA

X= Y-a Keterangan : X = kadar MDA

B

Y= serapan

a = slope

b = intercept

3.6.7. Pemeriksaan Kadar Karbonil

Pemeriksaan karbonil dilakukan dengan menggunakan metode Levine. Prinsip reaksi antara *2,4-dinitrophenylhidrazine* dan protein karbonil yang akan menghasilkan hidazon, yang dapat diukur pada panjang gelombang 370 nm.

Tabel 3.4. Cara kerja pemeriksaan senyawa karbonil

Bahan	Uji	Kontrol
Sampel	100 μL	100 μL
DNPH	400 μL	-
HCL 2,5 M	-	400 μL
Inkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam, vorteks setiap 15 menit		
TCA 20%	500 μL	500 μL
Vorteks, inkubasi dalam es selama 5 menit, sentrifus 10.000g, 4°C, 10 menit		
Buang supernatan, resuspend pelet dengan 500 μL TCA 10% inkubasi di es 5 menit, sentrifus 10.000g, 4°C, 10 menit		
Buang supernatan, resuspend pelet dengan 500 μL etanol : etil asetat (1:1), sentrifus 10.000g, 4°C, 10 menit, ulangi 3 kali		
Resuspend pelet dengan 250 μL guanidin, vorteks, sentrifus 10.000g, 4°C, 10 menit		
Ambil supernatan dan ukur serapan dengan spektrofotometer pada λ370		

Protein karbonil dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Protein karbonil (nmol/ml)} = [(\text{CA}) / (*0.011 \mu\text{M}^{-1})] (250 \mu\text{L} / 100 \mu\text{L})$$

CA = *corrected absorbance* = absorban uji – absorban kontrol

* koefisien ekstensi DNPH pada λ 370 nm, lebar kuvet 0,5 cm

3.6.8. Pengukuran Kadar Protein

Aktivitas MnSOD pada jaringan tersebut akan dihitung per mg protein sehingga dapat dibandingkan. Kadar protein dihitung pada λ 280 nm dan dibandingkan dengan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Konsentrasi BSA yang digunakan sebagai standar yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 mg/ml. sampel jaringan yang akan diukur kadar proteinnya, dari homogenat hati diambil 2 μ l sampel diencerkan dengan 998 μ L aquabidest (pengenceran 500x).

3.7. Analisis Uji Statistik

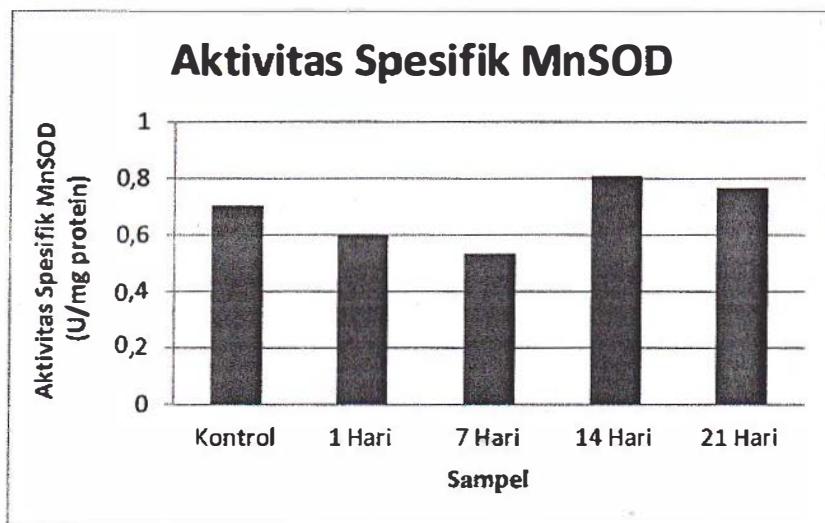
Untuk melihat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik uji-T. Untuk melihat adanya hubungan yang bermakna antara aktivitas spesifik MnSOD dengan stres oksidatif dan aktivitas spesifik GPT digunakan uji korelasi pearson.

BAB IV

HASIL

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Medikal FKUI berdasarkan surat No.80/PT02.FK/ETIK/2010. Sampel penelitian ini adalah jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, kelompok hipoksia 1,7,14 dan 21 hari.

4.1. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

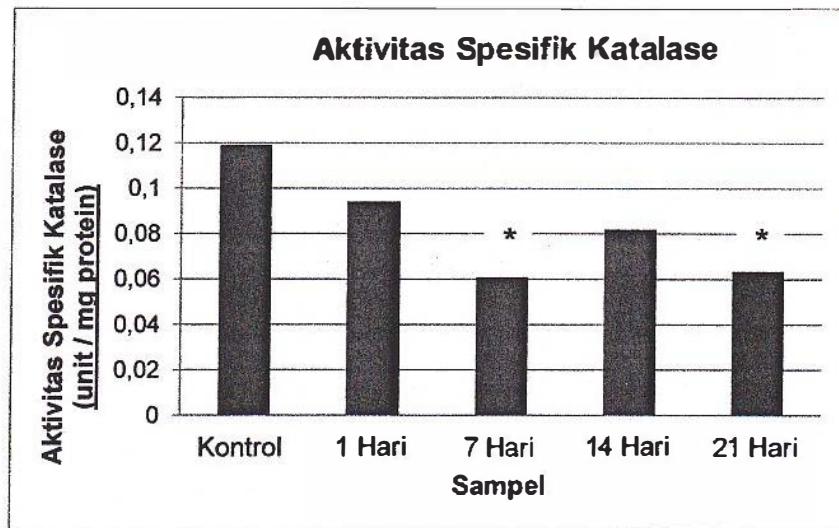


Gambar 4.1. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 , 7 , 14 dan 21 hari

Dari gambar 4.1 diatas dapat dilihat aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Dari hasil uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok uji dan kontrol. Pada hipoksia 1 dan 7 hari terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD, kemudian aktivitas MnSOD terlihat meningkat pada hipoksia hari ke 14 dan 21 hari (walaupun secara statistik tidak bermakna). Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Dewi yang melaporkan pada hipoksia yang terjadi di jantung terdapat penurunan aktivitas MnSOD pada hipoksia 1 hari.⁹

4.2. Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Pengukuran aktivitas enzim katalase dilakukan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 210 nm.

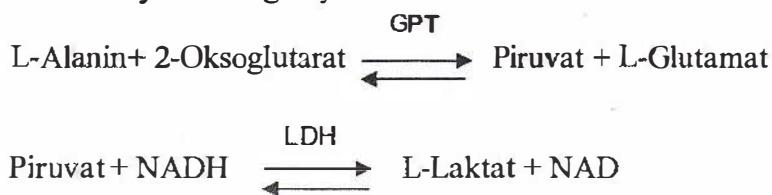


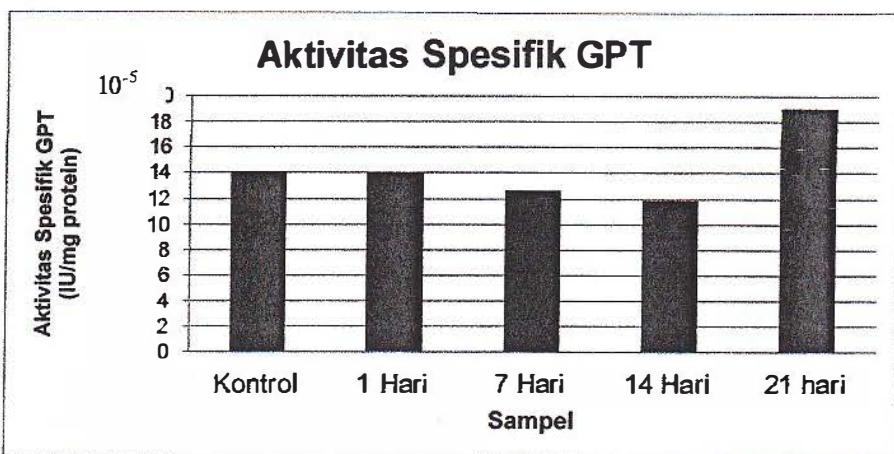
Gambar 4.2. Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$)

Aktivitas spesifik enzim katalase secara keseluruhan mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kontrol. Pada tikus hipoksia 7 dan 21 hari, penurunan aktivitas enzim katalase secara statistik bermakna bila dibandingkan dengan kontrol dengan nilai $p = 0.038$ dan $p = 0.001$.

4.3. Aktivitas spesifik GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Pemeriksaan GPT dilakukan dengan menggunakan kit GPT, Prinsip pemeriksaan GPT dengan kit ini berdasarkan metode yang dianjurkan oleh IFCC dari metode yang dikemukakan oleh Wroblewski dan Ladue dan dimodifikasi oleh Henry dan Bergmeyer.³⁹



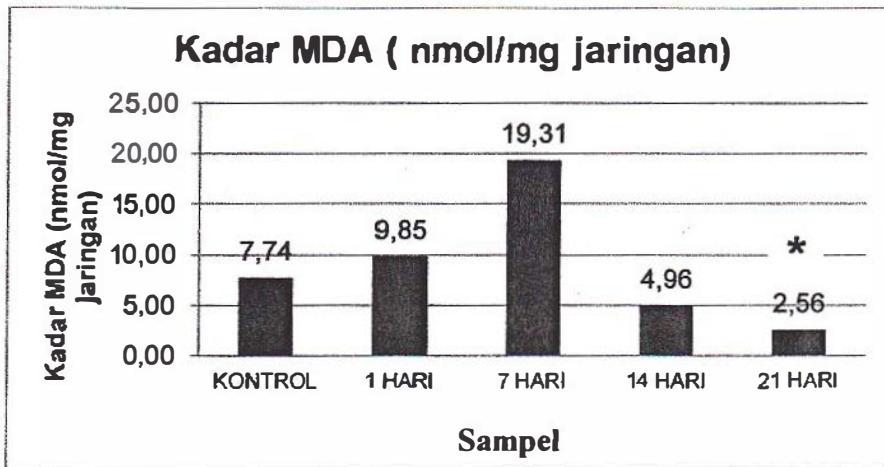


Gambar 4.3. Aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 21, dan 14 hari

Hasil pemeriksaan aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia ditunjukkan oleh gambar diatas. Secara umum tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas spesifik enzim GPT pada kelompok uji bila dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas GPT cenderung mengalami sedikit penurunan pada kondisi hipoksia 1, 7, dan 14 hari. Pada hipoksia 21 hari terjadi peningkatan aktivitas GPT, rata-rata aktivitas GPT pada tikus yang diinduksi hipoksia 21 hari sebesar 19.01×10^{-5} IU/mg protein, sedangkan rata-rata aktivitas GPT pada hati tikus kontrol sebesar 14.04×10^{-5} IU/mg protein, namun peningkatan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0.061$).

4.4. Kadar MDA hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan TCA pada suhu 96°C akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang akan memberikan serapan pada panjang gelombang 530 nm.

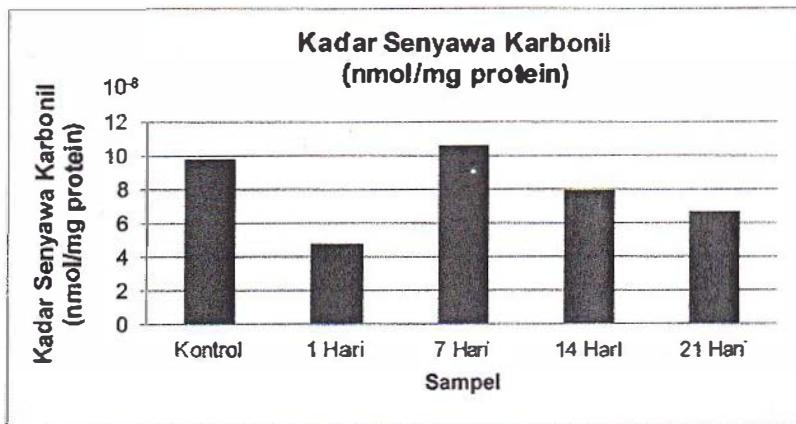


Gambar 4.4. Kadar MDA pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 hari, 7 hari 14 hari dan 21 hari. Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik terhadap kelompok kontrol (Uji T, $p<0.05$)

Dari gambar 4.4 terlihat kenaikan kadar MDA sampai Hipoksia hari ke-7, kemudian mengalami penurunan sampai hipoksia 21 hari. Kadar MDA pada tikus hipoksia 7 hari tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol ($p=0,06$) sedangkan penurunan kadar MDA pada tikus hipoksia 21 hari berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol ($p=0,045$).

4.5. Kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

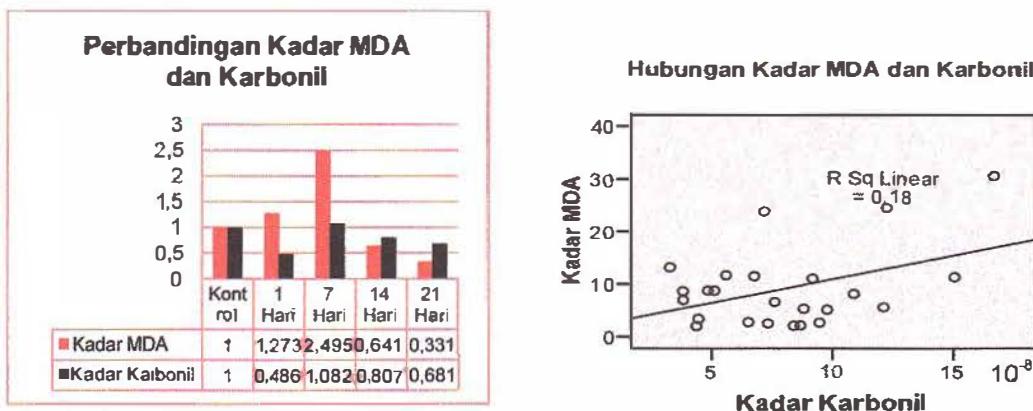
Prinsip pengukuran senyawa karbonil adalah gugus karbonil akan bereaksi dengan senyawa *2,4 dinitrofenilhidrazine* membentuk suatu senyawa berwarna yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 370 nm.



Gambar 4.5. Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 hari dan 21 hari

Dari gambar diatas terlihat secara keseluruhan kadar senyawa karbonil yang cenderung menurun dengan bertambahnya hipoksia, namun penurunan ini secara statistik tidak bermakna ($p>0.05$) .

4.6. Kadar MDA dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

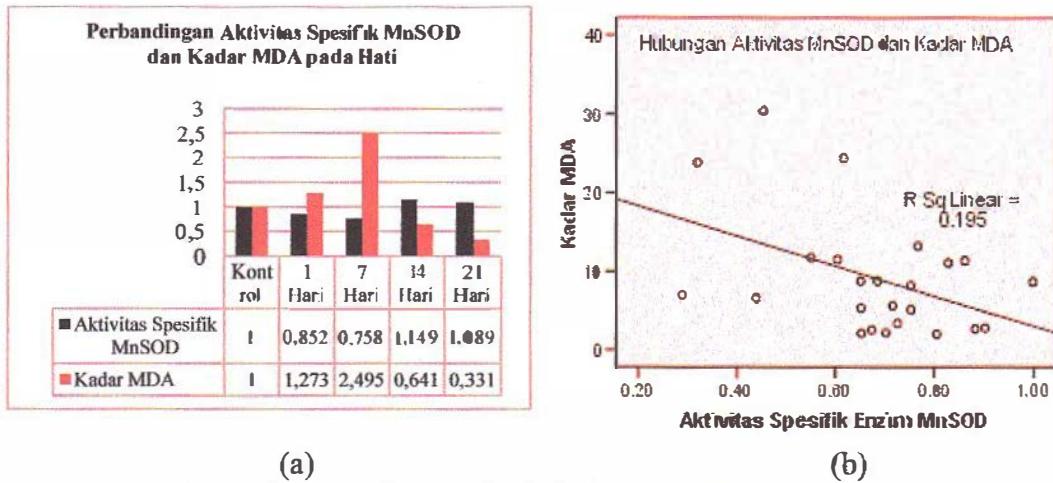


Gambar 4.6. Kadar MDA dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan kadar MDA dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara kadar MDA dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan bermakna positif sedang ($R= 0,424$, $p<0.05$)

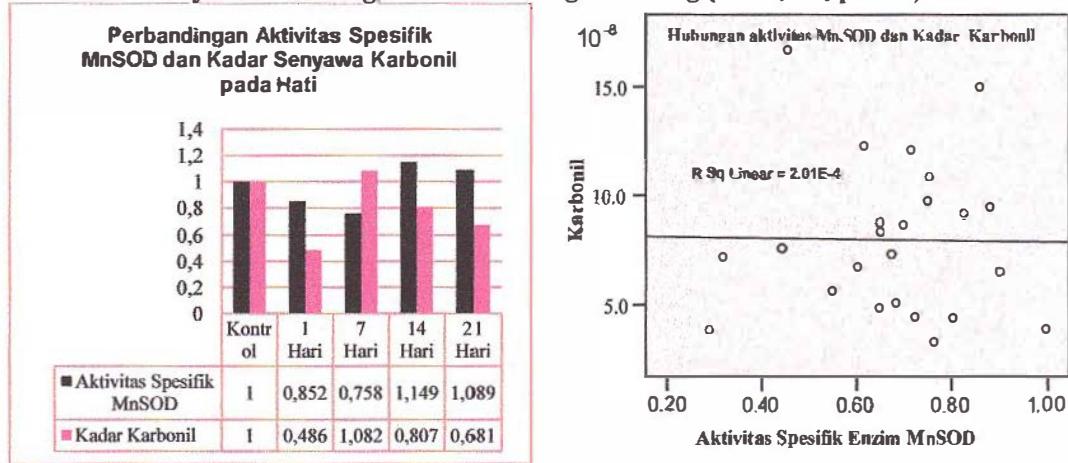
Dari gambar diatas, terlihat secara keseluruhan pola diagram batang antara kadar MDA dan karbonil serupa. Pada hipoksia 1 dan 7 hari didapat perbandingan kadar MDA yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan produksi MDA terjadi pada tahap awal hipoksia. Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari didapat perbandingan kadar karbonil yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar MDA. Hal ini menunjukkan produksi karbonil yang terjadi pada keadaan hipoksia lanjut. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Margaret yang menyatakan pada darah penderita kanker paru yang telah lanjut didapat kadar karbonil yang tinggi dan kadar MDA yang rendah,⁴⁰ sedangkan Nida melaporkan pada tikus dengan kanker payudara pasca induksi DMBA melaporkan kadar MDA plasma yang tinggi dan kadar karbonil plasma rendah.⁴¹ Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang positif sedang antara kadar MDA dan karbonil. Hubungan yang positif menunjukkan kenaikan kadar MDA akan menyebabkan kenaikan kadar karbonil. Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat reaksi antara MDA dan protein atau reaksi oksidasi

rantai samping protein oleh ROS. Hal ini yang menyebabkan hubungan yang tidak kuat antara MDA dan karbonil.

4.7. Aktivitas spesifik MnSOD dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik



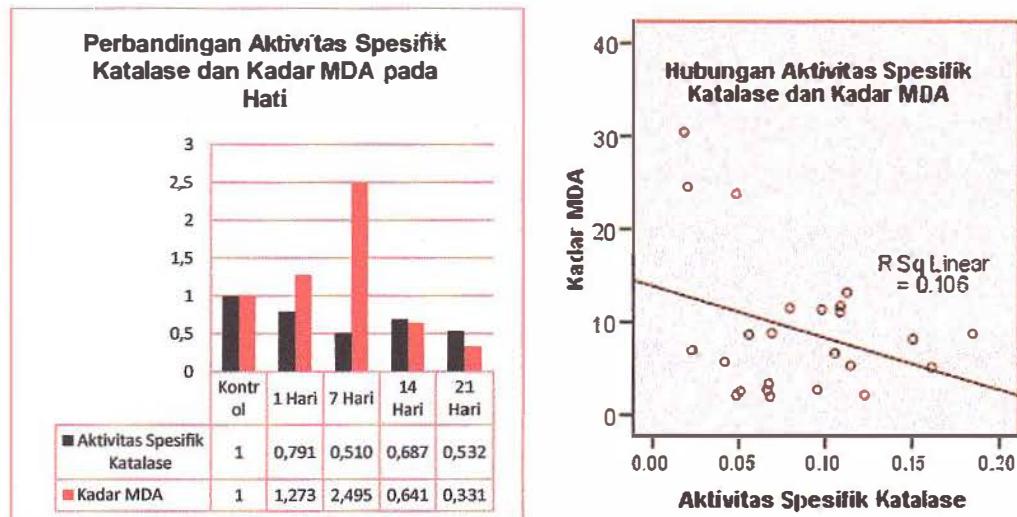
Gambar 4.7. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan bermakna negatif sedang ($R = -0,442$, $p < 0,05$)



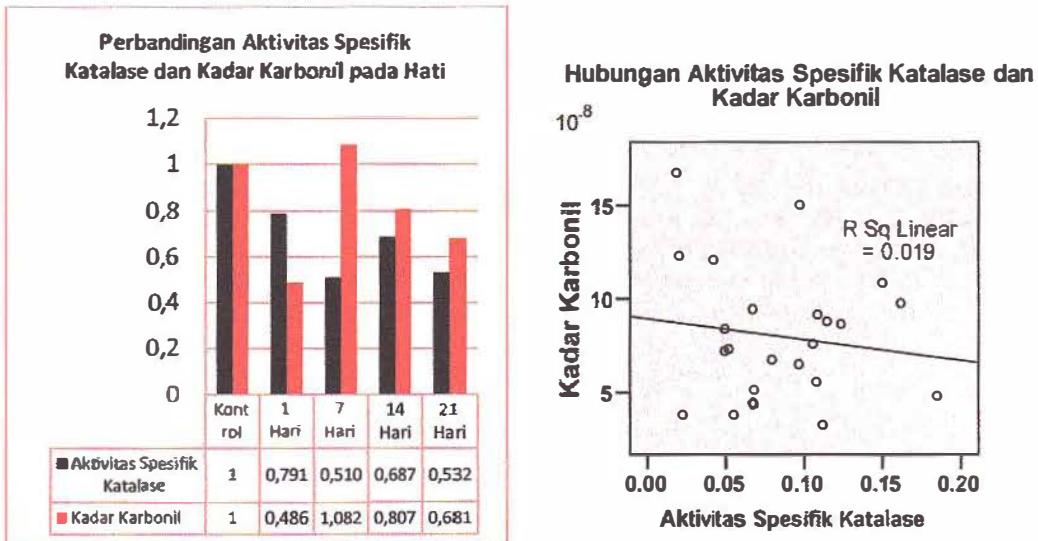
Gambar 4.8. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah ($R = -0,014$, $p > 0,05$)

Dari gambar 4.7. terlihat pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipoksia sistemik kronik ditemukan adanya hubungan negatif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA ($R = -0,442$). Hubungan ini secara statistik bermakna ($p = 0,031$).

4.8. Aktivitas spesifik katalase dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik



Gambar 4.9. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif sedang ($R = -0,326$, $p > 0,05$)



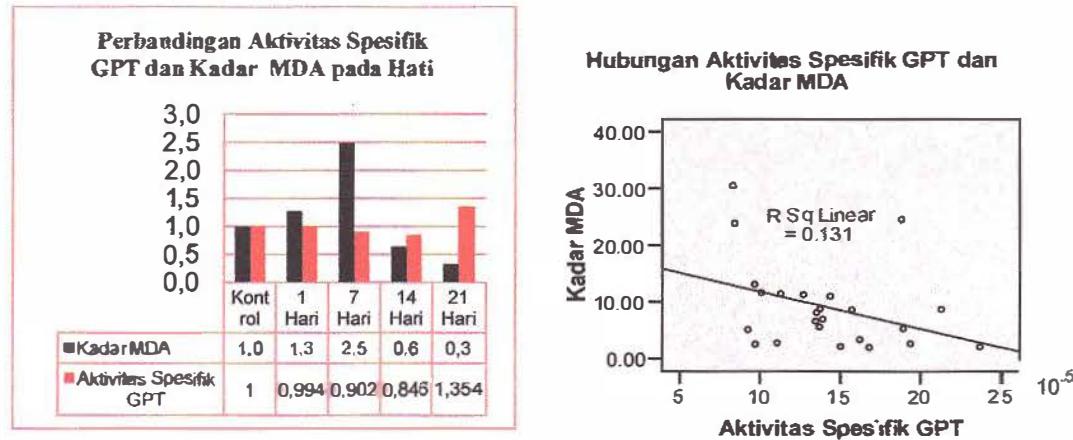
Gambar 4.10. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil pada bati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah ($R = -0,138$, $p > 0,05$)

Dari gambar 4.9 terlihat pola yang berlawanan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Analisis korelasi pearson menyatakan terdapat

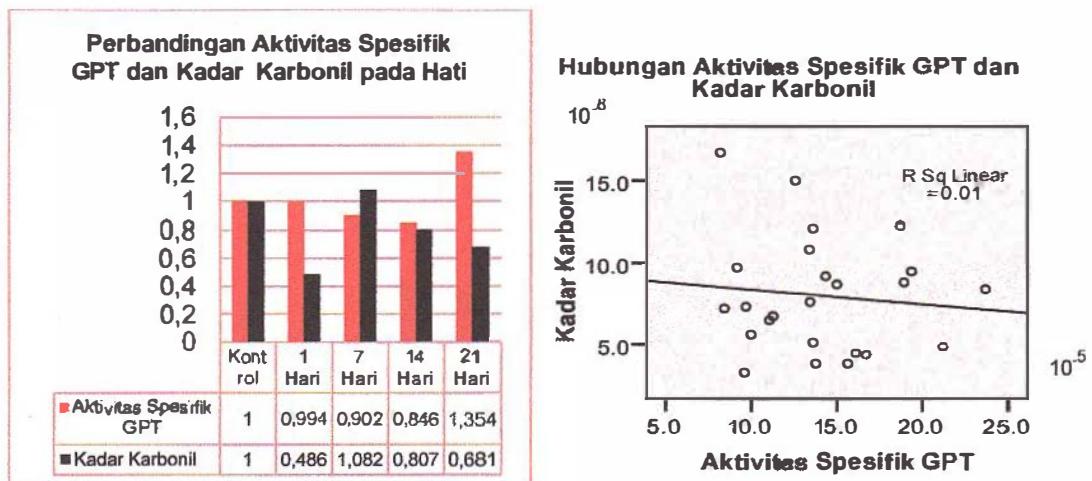
hubungan negatif sedang antar keduanya ($R=-0,326$). Pada gambar 4.10 terlihat hasil analisis korelasi pearson antara aktivitas spesifik katalase dan kadar senyawa karbonil dimana didapatkan hubungan lemah ($R=-0,138$). Hal ini menunjukkan adanya peran katalase dalam menghambat pembentukan MDA dan karbonil.

Hubungan antara aktivitas katalase dan kadar senyawa karbonil menunjukkan hubungan yang sedikit lebih kuat dibandingkan dengan hubungan antara aktivitas MnSOD dan senyawa karbonil ($R= -0.014$). Hal ini menunjukkan katalase lebih berperan menghambat pembentukan senyawa karbonil bila dibandingkan MnSOD.

4.9. Aktivitas spesifik GPT dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik



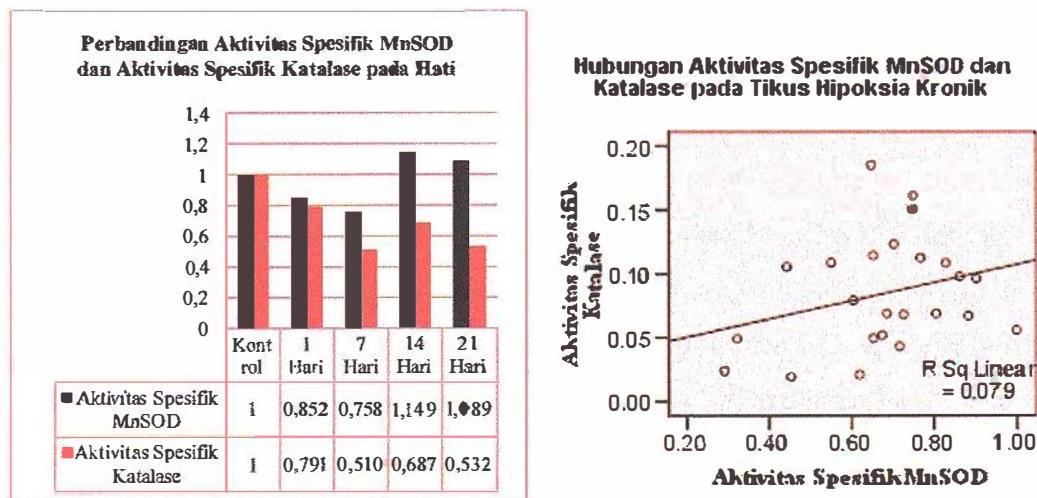
Gambar 4.11. Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA pada batি tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif sedang ($R= -0,362$, $p>0.05$)



Gambar 4.12. Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi bipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah ($R = -0,101$, $p > 0,05$)

Pada gambar 4.11 terlihat pola yang saling berlawanan antara aktivitas GPT dan kadar MDA. Dari analisis korelasi pearson didapat hubungan negatif sedang ($R = -0,362$).

4.10. Aktivitas spesifik MnSOD dan aktivitas spesifik katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik



Gambar 4.13. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik enzim katalase setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik enzim katalase. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan positif lemah ($R= 0,281$, $p>0.05$)

dari gambar 4.13 terlihat pola yang serupa antara aktivitas MnSOD dan katalase sejak hari pertama hipoksia, ini menunjukkan peran katalase sebagai scavenger H_2O_2 dilakukan sejak hari pertama.

BAB V

PEMBAHASAN

Menurunnya aktivitas MnSOD pada hipoksia 1 dan 7 hari diduga disebabkan karena peningkatan produksi O_2^- yang berlebihan sebagai substrat MnSOD, sehingga diduga mengakibatkan enzim MnSOD menjadi jenuh dan tidak dapat lagi mengikat substrat pada saat pemeriksaan. Peningkatan aktivitas MnSOD pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari diduga karena terjadi proses adaptasi dari sel hati terhadap hipoksia, dimana selain MnSOD, terdapat berbagai sistem pertahanan antioksidan lain dari sel, yang dapat membantu menekan produksi ROS. Hal ini menyebabkan MnSOD menjadi tidak jenuh dan terlihat meningkat aktivitasnya saat pemeriksaan.

Penurunan aktivitas katalase sesuai dengan penelitian yang dilakukan Putri⁴² yang melaporkan bahwa pada kondisi hipoksia hipobarik terjadi penurunan aktivitas katalase pada hati tikus. Studi yang dilakukan Martin⁴³ melaporkan bahwa pada hipoksia hipobarik dapat menyebabkan penurunan bennakna ekspresi mRNA enzim-enzim antioksidan yang ada di hati, termasuk katalase.

Penurunan aktivitas GPT pada kondisi hipoksia 1 sampai 14 hari menunjukkan adanya kerusakan hati, namun kerusakan ini tidak terlalu berat karena tingginya kadar antioksidan yang terdapat pada sel hati. Penelitian yang dilakukan Jusman⁴⁴ di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia menyebutkan bahwa kerusakan pada jaringan hati meningkat seiring dengan adanya hipoksia, akan tetapi masih dalam batas kerusakan sedang. Enzim GPT mengkatalisis reaksi perubahan alanin menjadi piruvat. Peningkatan aktivitas enzim GPT pada hipoksia 21 hari diduga karena diperlukannya piruvat dalam metabolisme anaerob. Piruvat dapat masuk ke jalur glukoneogenesis untuk membentuk glukosa, kemudian glukosa akan mengalami proses glikolisis anaerob yang akan menghasilkan ATP. Hasil ini sesuai dengan penelitian Evendi⁴⁵ yang melaporkan terjadi peningkatan ekspresi isozim LDH1 dan LDH2 selama keadaan hipoksia. Dimana diketahui bahwa isozim LDH1 dan LDH2 berperan mengubah laktat menjadi piruvat. Sebab lain dari pembentukan piruvat, diduga piruvat yang terbentuk diubah menjadi glukosa 6-fosfat yang

selanjutnya akan masuk kedalam jalur *HMP shunt*. *HMP shunt* berperan menghasilkan NADPH yang dibutuhkan untuk proses reduksi GSSG menjadi GSH, dimana GSH berperan sebagai antioksidan. Penelitian lain menyebutkan peran piruvat sebagai antioksidan dengan menghambat kerja NADH oksidase. Seperti diketahui sebelumnya NADH oksidase adalah sumber utama dari terbentuknya superoksid. Akibat penghambatan pembentukan O_2^- oleh piruvat, maka akan terjadi penghambatan pada proses peroksidasi lipid dan pembentukan senyawa karbonil.⁴⁶ Penelitian yang dilakukan Roudier³⁴ dkk melaporkan bahwa piruvat dapat mengurangi kerusakan DNA selama terjadinya hipoksia pada karsinoma sel hati. Lee³⁵ dkk melaporkan dalam penelitiannya bahwa etil piruvat, suatu senyawa piruvat yang mengalami modifikasi agar lebih stabil dalam larutan, secara bermakna dapat menurunkan kadar MDA dan senyawa NO yang terbentuk pada jantung dan hati tikus yang diintoksikasi dengan paraquat.

Hipoksia akan menyebabkan peningkatan kadar ROS. Pembentukan ROS yang berlebihan dapat melampaui kemampuan netralisir dari antioksidan. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya kerusakan oksidatif yang menyebabkan kerusakan berbagai makro molekul dalam sel. Peningkatan kadar MDA menunjukkan meningkatnya stres oksidatif akibat terjadinya hipoksia. Penelitian yang dilakukan Halim menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.¹² Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA. Pada kondisi ini diduga telah terjadi perubahan regulasi pertahanan terhadap stres oksidatif yang terjadi pada jaringan hati. Kemungkinan lain adalah terbatasnya kadar oksigen pada sel menyebabkan kurangnya propagasi pada proses pembentukan MDA, sehingga MDA yang dihasilkan hanya berasal dari ROS yang terbentuk akibat hipoksia.

Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat adanya O_2^- dan MDA. O_2^- yang terbentuk pada keadaan hipoksia dapat mengalami protonasi menjadi OH⁻, dimana OH⁻ jauh lebih bersifat reaktif bila dibandingkan O_2^- . Pada pH fisiologis terjadi keseimbangan antara jumlah O_2^- dan OH⁻, namun pada permukaan membran dimana pH nya lebih sedikit asam, akan terjadi protonasi dari O_2^- menjadi OH⁻. OH⁻ dapat menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid membran dan menyebabkan terbentuknya MDA.⁷ Penurunan kadar karbonil diduga karena

banyaknya konversi O_2^- menjadi OH^- , namun pembentukan senyawa karbonil oleh MDA belum terjadi.

Penelitian ini mendapatkan hasil kadar MDA yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan hati akibat hipoksia belum terlalu besar. Diduga sistem pertahanan antioksidan hati dapat mencegah kerusakan hati yang lebih lanjut. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Jusman⁴⁴ yang menyatakan kerusakan hati sedang terjadi pada tikus hipoksia. Sampai hipoksia 7 hari kadar MDA terus meningkat, hal ini menandakan keadaan stres oksidatif yang terus meningkat, disebabkan peningkatan produksi ROS. Sementara itu aktivitas spesifik MnSOD cenderung menurun sampai hipoksia 7 hari. Hal ini diduga karena produksi ROS yang terjadi sangat berlebihan. Kenaikan jumlah ROS dapat menyebabkan peningkatan proses peroksidasi lipid yang akan menyebabkan peningkatan kadar MDA. Selain itu, peningkatan ROS dapat menyebabkan enzim MnSOD menjadi jenuh, sehingga tidak mampu lagi mengikat substrat O_2^- saat dilakukan pemeriksaan. Dewi⁹ 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 kemungkinan jumlah ROS yang terbentuk di hati akan lebih banyak dibandingkan yang terdapat dalam jantung dan darah. Diduga hal ini yang menyebabkan penurunan aktivitas MnSOD sampai hari ketujuh pada hipoksia di hati. Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas spesifik MnSOD, diduga telah terjadi perubahan pengaturan sistem pertahanan sel. Produksi ROS yang terus meningkat sejalan dengan keadaan hipoksia ditekan oleh sistem pertahanan sel yang lain, hal ini yang menyebabkan kadar MDA menurun, sementara itu enzim MnSOD menjadi tidak jenuh oleh substrat, sehingga pada saat pengukuran aktivitas spesifiknya meningkat.

Gambar 4.8 menunjukkan *scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang negatif lemah ($R = -0,014$) antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan

kadar senyawa karbonil, hubungan ini tidak bermakna secara statistik. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan yang lebih erat antara MDA dan MnSOD bila dibandingkan karbonil dan MnSOD. Hal ini menggambarkan keadaan sel hati yang belum mengalami kerusakan lanjut, sehingga aktivitas MnSOD lebih dimaksudkan untuk mengatasi peningkatan kadar MDA dibandingkan kadar karbonil. Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa enzim MnSOD berperan untuk mengatasi stres oksidatif pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. MDA merupakan hasil dari peroksidasi lipid. MDA dapat bereaksi dengan protein sehingga terbentuk senyawa karbonil. Proses peroksidasi lipid dimulai dengan pengambilan hidrogen dari PUFA oleh OH⁻. OH⁻ dapat dibentuk dari reaksi antara O₂⁻ dan H₂O₂. Katalase merupakan enzim yang berperan untuk mengkonversi H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Dengan demikian katalase mencegah pembentukan OH⁻ dan secara tidak langsung mencegah pembentukan MDA dan karbonil.

Peningkatan produksi ROS akan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid membran yang akan menyebabkan peningkatan kadar MDA. Selain itu ROS akan menyebabkan modifikasi ataupun kerusakan pada struktur enzim GPT, sehingga akan menghambat aktivitasnya. Hubungan yang tidak kuat antara kadar MDA, sebagai indikator stres oksidatif, dan aktivitas GPT, diduga disebabkan letak GPT yang terdapat pada sitosol sel hati. Diketahui bahwa pada sitosol sel hati banyak terdapat antioksidan GSH yang berperan untuk menetralisir ROS. Penelitian Halim melaporkan MDA sebagai indikator stres oksidatif meningkat sebanding dengan lamanya hipoksia, sedangkan GSH menurun dengan lamanya hipoksia. GSH sudah mengalami penurunan sejak awal hipoksia dan berlanjut sampai akhir waktu perlakuan pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan penggunaan GSH sebagai antioksidan pada jaringan hati dilakukan sejak hari pertama.¹²

Enzim Katalase merupakan enzim yang berperan sebagai *scavenger* H₂O₂ yang dihasilkan oleh MnSOD menjadi O₂ dan H₂O. Adanya pola yang sama antara MnSOD dan katalase, menunjukkan bahwa katalase bekerja sejak dari hipoksia 1 hari. Dari literatur diketahui bahwa katalase bekerja pada konsentrasi H₂O₂ yang tinggi,¹⁰ sehingga dapat disimpulkan pada kondisi hipoksia 1 hari telah terjadi produksi H₂O₂ yang tinggi oleh MnSOD. Hasil analisis statistik menunjukkan

hubungan yang positif lemah. Hubungan yang positif lemah ini mungkin disebabkan ada sistem lain yang juga bekerja sebagai *scavenger* H₂O₂. Antioksidan lain yang dapat berperan sebagai *scavenger* H₂O₂ misalnya GSH. Fungsi GSH disebabkan oleh adanya gugus -SH. GSH dapat dioksidasi menjadi GSSG dan H₂O, kemudian GSSG akan direduksi kembali menjadi GSH dengan bantuan enzim glutation reduktase, enzim ini membutuhkan kofaktor NADPH, NADPH ini berasal dari *HMP Shunt*, yaitu reaksi yang dikatalisis oleh enzim glukosa 6-P dehidrogenase.^{47,48} GSH dapat disintesis di semua sel, namun kadar GSH tertinggi ditemukan di jaringan hati.² Hubungan yang lemah antara aktivitas spesifik katalase dan MnSOD disebabkan juga karena letak kedua enzim tersebut berbeda. Aktivitas MnSOD terdapat pada mitokondria sedangkan mitokondria sel hati hanya mengandung sedikit katalase.¹⁰ Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga sebelum sampai ke peroksisom, H₂O₂ dikonversi terlebih dahulu oleh GSH yang banyak terdapat pada sitosol sel hati. Halim melaporkan 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

Hati adalah organ metabolismik terbesar dan penting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama seperti karbohidrat, lemak dan protein. Vitalnya fungsi hati menyebabkan hati memiliki beberapa sistem pertahanan yang berfungsi untuk mencegah terjadinya kerusakan oksidatif pada sel tersebut. Beberapa antioksidan endogen banyak terdapat di hati antara lain enzim MnSOD dan katalase. Dari penelitian ini diketahui bahwa enzim MnSOD bersama antioksidan lain berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan hati. Analisis korelasi pearson menyatakan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim (aktivitas spesifik MnSOD, katalase, dan GPT) dengan kadar MDA lebih kuat bila dibandingkan dengan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar senyawa karbonil. Ini menunjukkan kerusakan hati masih dalam derajat kerusakan sedang. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jusman yang menyatakan terdapat derajat kerusakan sedang pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.⁴⁴ Hubungan antara aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar MDA adalah hubungan negatif sedang. Diduga selain ketiga

enzim ini terdapat antioksidan lain yang bekerja mencegah kerusakan oksidatif. Antioksidan lain yang berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan hati adalah glutation. GSH, bentuk tereduksi dari glutation, paling banyak terdapat pada jaringan hati. Kadar GSH yang tinggi ini sesuai dengan aktivitas jalur *HMP shunt* yang tinggi di jaringan hati.¹⁰ Hubungan yang paling kuat terdapat pada hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD dan kadar MDA, ini menunjukkan peran MnSOD sebagai antioksidan primer untuk mencegah terjadinya kerusakan oksidatif. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan katalase positif lemah. Enzim MnSOD banyak terdapat di mitokondria dan berfungsi sebagai *scavenger O₂-* menjadi H₂O₂. Sementara itu pada mitokondria sel hati hanya terdapat sedikit katalase. Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga perbedaan lokasi inilah yang menjadi sebab mengapa hanya didapat hubungan positif lemah, antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase.

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa jaringan hati tikus memiliki sistem pertahanan antioksidan yang cukup baik dalam mencegah kerusakan oksidatif. Penelitian berikutnya dapat dilakukan untuk mengetahui peran antioksidan endogen, dalam mencegah kerusakan hati pada hewan yang memiliki tingkatan lebih tinggi dibanding tikus, yang selanjutnya dapat dilakukan penelitian untuk mengetahui peran antioksidan endogen tersebut pada hati manusia sebagai upaya mencegah kerusakan hati.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1.Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat diambil adalah :

1. Tidak terjadi perubahan bermakna aktivitas spesifik MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik
2. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik MnSOD dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan senyawa karbonil negatif lemah.
3. Aktivitas spesifik katalase mengalami penurunan pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Penurunan bermakna terjadi pada hipoksia 7 dan 21 hari
4. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik katalase dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik katalase dan senyawa karbonil negatif lemah.
5. Tidak terjadi perubahan bermakna aktivitas spesifik GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik
6. Terdapat hubungan negatif antara aktivitas spesifik GPT dan stres oksidatif, dimana hubungan antara aktivitas spesifik GPT dan kadar MDA negatif sedang, sementara itu hubungan aktivitas spesifik GPT dan senyawa karbonil negatif lemah.
7. Terdapat hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

4.11. Saran

1. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi, untuk memastikan keadaan sel hati sebenarnya.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai peran antioksidan piruvat pada keadaan hipoksia lanjut di hati.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sistem pertahanan antioksidan di hati dan yang membedakannya dengan jaringan lain, sehingga hati menjadi lebih tahan terhadap kerusakan oksidatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80.
2. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and regulation of redox-responsive transcription factors in development and physiology. *Respir Res* 2002;3:1-27.
3. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimia Polonica* 2004;5:437-46.
4. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2008;17(12):3298-305.
5. Harju T, Wiik RK, Sirvio R, Paakkko P, Crapo JD, Oury TD, et al. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *Eur Respir J* 2004;24:765-71
6. Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH. Smoking associated mitochondrial DNA mutation and lipid peroxidation in human lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:901-9.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular Responses to Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, Senescence and Death. In *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007: 187-267
8. Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 2000;3:3-8.
9. Dewi S. Ekspresi gen Manganese superoxide dismutase pada jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008
10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant Defences : Endogenous and Diet Derived. In *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007 : 79-186
11. Sherwood L. Fisiologi manusia.edisi 2. Terjemahan.dr.Pendit BU. Jakarta:EGC.2001.Hal.565
12. Halim A. Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.

-
- 13 . Papandreou, I, Powell,A,Lim,AL & Denko,N. Cellular reaction to hypoxia : sensing and responding to an adverse environment. *Mutat Res* 2005 ; 569, 87-100
 14. Vaupel P , Harisson L. Tumor hypoxia : causative factors, compensatory mechanism, and cellular respons. *Oncologist*.2004 ; 9 Suppl 5 : 4-9
 15. Giaccia, AJ., et al. The Biology of Hypoxia: The Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function, and Disease. *Genes & Development*. 2004;18:2183-94)
 16. Ran R, Xu H , Lu A , Bernaudin M , Sharp FR.Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev Neurosci* 2005; 27:87-92
 17. Simon HU, Yehia AH, Scaffer FL. Role of reavtive Oxygen species(ROS) in Apoptosis Induction. *Apoptosis* 2000;5:415-8
 18. Semenza GL. Regulation of Mammalian O₂ Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 Annual Review of Cell and Developmental Biology; 1999; 15:pg :551
 - 19 . Halliwell B, Gutteridge JMC. The Chemistry of Free Radicals and Related 'Reactive Species'.In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007 : 30-74
 20. Oberly TD. Oxidative damage and cancer. *American Journal of Pathology*. 2002;160(2):403-8
 - 21 . Stryer L. Biochemistry.5thed.W.H. Freeman and Company
 22. 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>
 23. Jetawattana S. Role of MnSOD in the Regulation of HIF-1α. [Thesis].Graduate College University of Iowa. May 2008
 24. Clair DS. Manganese superoxide dismutase : genetic variation and regulation. *J Nutr* [0022-3166/04]. 2004 [cited 2008 Apr 12];134:3190S-1S. Available from: The Pros and Cons of Antioxidants.
 25. Kinnula VL, Torkkeli T, Kristo P, Sormunen R, Soini Y, Paako P, et al. Ultrastructural and chromosomal studies on manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol* 2004; 31:147-53.
 26. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutase in the lung and human lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1600-19.

27. Ho JC, Zheng S, Comhair AAS, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001;1:8578-85.
28. Quint P. Kinetic and Structural Effects of interfacial Interruption and Protein nitration in Human Manganese Superoxide Dismutase. Florida University 2006
29. Jefferson J, Perry P, Fan L, Tainer JA. Developing master key to brain pathology, *cancer* and aging from the structural biology of protein controlling *reactive oxygen species* and DNA repair. *Neuroscience* 2007; 145(4):1280-99
30. Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, et al. Manganese superoxide ~~decrease~~ alanin to valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1818-21.
31. Catalase structure. *Wikipedia* Commons.[cited 2010 june 12]. Available from: http://en.wikipedia.org/wikimedia.org/wiki/File:Catalase_Structure.png.
32. Winniewski et al. Human alanine aminotransferase 2 in complex with PLP.SOC. [cited 2010 june 15].available from : http://www.rcsb.org/structures/structure_description/3IHJ/
33. Alanine transaminase. *Wikipedia* foundation. . [cited 2010 june 15]. http://en.wikipedia.org/wikimedia.org/wiki/File:Alanine_amino_transf%C3%A9rase.png
34. Roudier E, Bacheler C, Perrin A. Pyruvate reduces DNA damage during hypoxia and after reoxygenation in hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Journal* 274, Oct 2007; 5188-98
35. Lee JH, Kwon HY, Jo YH, Suh GJ and Youn YK. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2008 27: 49-54
36. Junqueira L, Carlos. Histologi Dasar. Terjemahan Jan Tambayong. ed.8. Jakarta: RGC. 1997
37. Microscopic structure of the liver. *Britanica encyclopedia*. [cited 2010 june 11]. Available from: <http://www.britannica.com/bps/image/275415/61404/Microscopic-structure-of-the-liver-Liver-cells-or-hepatocytes-have.cited>
38. Ferdinand F. Mekanisme molekulal *gagal* jantung yang diinduksi hipoksia : peran HIF-1α dalam regulasi gen BNP. Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Indonesia, 2008.

-
39. Yoshiro S, Chie S, Ryo K, Katsuhiro K. Reagen for GPT assay [cited 2010 March 5] Available from : <http://www.freepatentsonline.com/6645735.html>
 40. Margareth A. Aktivitas spesifik MnSOD pada darah penderita kanker paru dengan dengan riwayat merokok : hubungannya dengan stres oksidatif dan genotype[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008
 41. Nida K. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008
 42. Putri W N. Aktivitas spesifik katalase jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. [skripsi]. Jakarta:Universitas Indonesia ; 2008
 43. Martin R, Fitzl G, mozet c, Martin H, welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxydative enzymes in rat liver and kidneys. *Experimental gerontology*. 2002; 37(12):1481-7
 - 44 . Jusman SWA. Respon jaringan hati terhadap hipoksia sistemik kronik : analisis regulasi ekspresi gen sitoglobin. *Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia*, 2010
 45. Evendi A. Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktivitas spesifik dan pola izozim laktat dehidrogenase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008
 46. Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bünger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . Nov 2008. 279: H2431-H38
 47. Storey, K.B, Storey J.M. Oxygen Limitation and Metabolic Rate Depression. In : Storey, K.B. editor. *Functional metabolism : Regulation and Adaptation*. John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004
 48. Hermes-Lima,M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radical. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004