

UNIVERSITAS INDONESIA

**AKTIVITAS SPESIFIK KATALASE JARINGAN HATI TIKUS
YANG DIINDUKSI HIPOKSIA HIPOBARIK AKUT BERULANG**

SKRIPSI

**WIDYA NUGROHO PUTRI
010500182Y**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
JAKARTA
JULI 2009**

UNIVERSITAS INDONESIA

**AKTIVITAS SPESIFIK KATALASE JARINGAN HATI TIKUS
YANG DIINDUKSI HIPOKSIA HIPOBARIK AKUT BERULANG**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran**

**WIDYA NUGROHO PUTRI
010500182Y**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
JAKARTA
2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Widya Nugroho Putri
NPM : 010500182Y
Tanda Tangan :
Tanggal : 3 Juli 2009



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Widya Nugroho Putri
NPM : 010500182Y
Program Studi : Pendidikan Dokter
Judul Skripsi : Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Hati Tikus yang
Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi ()

Penguji : Dr. T. Mirawati Sudiro, SpMK, Ph.D ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 3 Juli 2009

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi berjudul Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik.

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mendapat gelar sarjana pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih pada sebesar-besarnya kepada DR. rer. Physiol. Dr. Septelia Inawati Wanandi selaku pembimbing penelitian yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan pengarahan, sehingga penelitian dan penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan. Ucapan terima kasih penulis sampaikan juga kepada:

1. Dr. T. Mirawati Sudiro, Sp.MK, Ph.D. yang telah bersedia menjadi tim penguji untuk skripsi ini.
2. Dr. Reni Paramita M. Biomed atas kesediaan beliau membimbing, mengarahkan, dan mendampingi penulis selama proses penelitian.
3. Dr. Wawan Mulyawan yang telah mengizinkan penulis menggunakan sampel penelitian beliau, memungkinkan penelitian ini terlaksana.
4. Ayahanda dan ibunda tercinta yang telah mengiringi dengan doa, serta mendukung baik secara moral maupun material
5. Teman-teman kelompok riset, Silvia Febrianti dan R. Ayu Anatriera atas kerjasama, semangat, dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Pihak-pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan guna penyempurnaannya.

Jakarta, 3 Juli 2009

Penulis

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS
(Hasil Karya Perorangan)**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Widya Nugroho Putri
NPM : 010500182Y
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Hati Tikus yang Dinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti NonEksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 3 Juli 2009
Yang menyatakan

(Widya Nugroho Putri)

ABSTRAK

Nama : Widya Nugroho Putri
Program Studi : Pendidikan Dokter
Judul : Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

Hipoksia pada ketinggian diketahui menyebabkan stress oksidatif. Dilakukan penelitian mengenai aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus dengan metode spektrofotometri untuk mengukur pemecahan hidrogen peroksida. Tikus dipajankan pada hipoksia hipobarik akut berulang dengan simulasi ketinggian 35,000 kaki yang diturunkan bertahap ke ketinggian 25,000 kaki, 20,000 kaki, lalu 18,000 kaki. Hewan uji dibagi ke dalam 4 kelompok: 1) diberi 1 kali perlakuan, 2) diberi 2 kali perlakuan, 3) diberi 3 kali perlakuan, 4) diberi 4 kali perlakuan, dengan setiap prosedur diselingi periode normoksia selama 7 hari. Hipoksia menyebabkan penurunan aktivitas spesifik katalase pada semua kelompok uji. Penurunan bermakna didapatkan pada kelompok 2 ($p = 0.008$), 3 ($p = 0.008$), dan 4 ($p = 0.008$). Hasil pada kelompok 1 tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan kontrol ($p = 0.548$). Hipoksia hipobarik menginduksi penurunan aktivitas spesifik katalase hati.

Kata kunci:

Katalase, aktivitas spesifik, hati, hipoksia hipobarik

ABSTRACT

Name : Widya Nugroho Putri
Programme of Study : Medical Education
Title : Specific Activity of Catalase in Hypobaric Hypoxia-
Induced Rat Liver

Hypoxia at high altitude is known as a cause of oxidative stress. Specific activity of catalase in rat liver submitted to recurrent acute hypobaric hypoxia were studied by means of measuring the breakdown of hydrogen peroxide spectrophotometrically. Animals were submitted to simulated altitudes of 35,000 ft lowered gradually to 25,000 ft, 20,000, and 18,000 ft. The experimental groups were as follows: 1) rats exposed to one procedure, 2) exposed to two procedures, repeatedly, 3) exposed to three-times of procedures, and 4) exposed to four-times of procedures, each procedure was interrupted with 7 days period of normoxia. Hypoxia produced a decrease in specific activity of liver catalase in all experimental groups. Significant decreases were showed in group 2 ($p = 0.008$), 3 ($p = 0.008$), and 4 ($p = 0.008$). Group 1 showed no significant difference compared to control group ($p = 0.548$). Hypobaric hypoxia induces a decrease in the specific activity of catalase in rat liver.

Keywords:

Catalase, specific activity, liver, hypobaric hypoxia

DAFTAR ISI

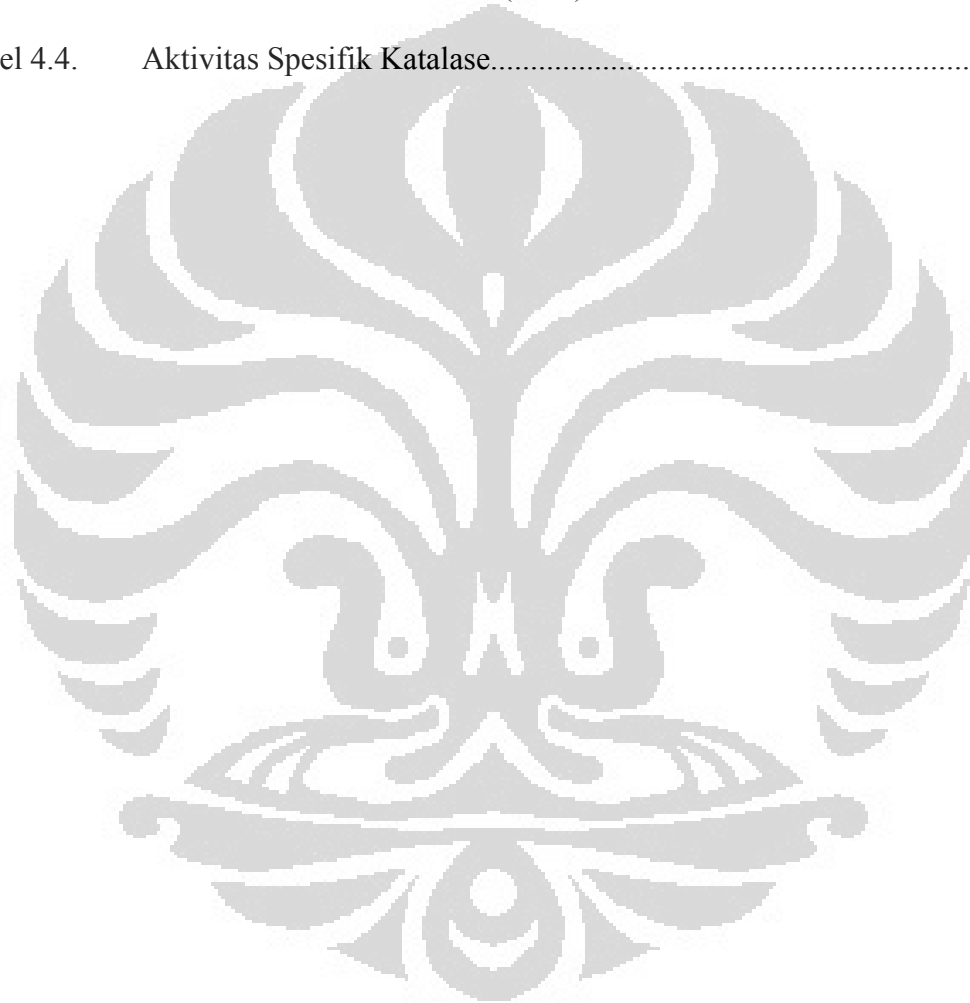
| | |
|---|----------|
| HALAMAN JUDUL..... | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iii |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | iv |
| KATA PENGANTAR..... | v |
| LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH..... | vi |
| ABSTRAK..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| DAFTAR ISI..... | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | |
| 1. PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 4 |
| 1.3. Hipotesis Penelitian..... | 4 |
| 1.4 Tujuan Penelitian..... | 4 |
| 1.4.1 Tujuan Umum..... | 4 |
| 1.4.2 Tujuan Khusus..... | 5 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 5 |
| 1.5.1 Manfaat bagi Peneliti..... | 5 |
| 1.5.2 Manfaat bagi Peneliti Utama..... | 5 |
| 1.5.3 Manfaat bagi Perguruan Tinggi..... | 5 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| 2.1 Hati..... | 6 |
| 2.1.1 Anatomi..... | 6 |
| 2.1.2 Mikroarsitektur..... | 6 |
| 2.1.3 Fungsi..... | 9 |
| 2.1.4 Kerusakan..... | 12 |
| 2.1.5 Manifestasi Gangguan Fungsi Hati..... | 14 |
| 2.2 Hipoksia..... | 17 |
| 2.2.1 Definisi..... | 17 |
| 2.2.2 Klasifikasi..... | 17 |
| 2.2.3 Efek..... | 18 |
| 2.2.3.1 Efek pada Tingkat Seluler..... | 18 |
| 2.2.3.2 Efek pada Tingkat Organ..... | 20 |
| 2.3 Hipoksia pada Ketinggian..... | 22 |
| 2.3.1 Mekanisme Adaptasi pada Ketinggian..... | 25 |
| 2.3.2 Manifestasi Gangguan Fungsi Organ pada Ketinggian..... | 26 |
| 2.3.3 Ketinggian dan Stress Oksidatif..... | 26 |
| 2.3.3.1 Sistem Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif pada Ketinggian..... | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.3.2 | Efek Ketinggian pada Sistem Antioksidan..... | 29 |
| 2.3.4 | Efek Hipoksia dan Hipobaria pada Ketinggian pada Hati..... | 30 |
| 2.4 | Radikal Bebas..... | 30 |
| 2.4.1 | Definisi..... | 30 |
| 2.4.2 | Reaksi..... | 31 |
| 2.4.3 | Spesies Oksigen Reaktif..... | 31 |
| 2.4.3.1 | Jenis..... | 32 |
| 2.4.3.2 | Pembentukan..... | 33 |
| 2.4.3.3 | Efek Biologis..... | 35 |
| 2.5 | Antioksidan..... | 37 |
| 2.5.1 | Enzim-enzim Antioksidan..... | 38 |
| 2.6 | Katalase..... | 40 |
| 2.6.1 | Struktur..... | 40 |
| 2.6.2 | Mekanisme Kerja..... | 41 |
| 2.7 | Kerangka Konseptual..... | 43 |
| 3. | METODOLOGI PENELITIAN..... | 44 |
| 3.1 | Desain Penelitian..... | 44 |
| 3.2 | Tempat dan Waktu Penelitian..... | 44 |
| 3.3 | Sampel Penelitian..... | 44 |
| 3.4 | Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi..... | 45 |
| 3.5 | Besar Sampel..... | 46 |
| 3.6 | Prosedur Kerja..... | 46 |
| 3.6.1 | Identifikasi Variabel..... | 46 |
| 3.6.2 | Bahan dan Alat..... | 46 |
| 3.6.2.1 | Bahan..... | 46 |
| 3.6.2.2 | Alat..... | 46 |
| 3.6.3 | Perlakuan Hipoksia Hipobarik..... | 47 |
| 3.6.4 | Pengambilan Sampel..... | 48 |
| 3.6.5 | Pembuatan Pelarut..... | 49 |
| 3.6.6 | Pembuatan Homogenat Sampel..... | 50 |
| 3.6.7 | Optimasi Pengukuran..... | 50 |
| 3.6.7.1 | Penentuan Absorbansi Pengenceran..... | 50 |
| 3.6.7.2 | Penentuan Panjang Gelombang Maksimum..... | 50 |
| 3.6.7.3 | Penentuan Kinetik Katalase..... | 50 |
| 3.6.7.4 | Penentuan Pengenceran Optimal Sampel..... | 51 |
| 3.6.8 | Penentuan Kadar Protein..... | 51 |
| 3.6.8.1 | Penentuan Kurva Standar Protein..... | 51 |
| 3.6.8.2 | Penentuan Konsentrasi Protein Jaringan..... | 51 |
| 3.6.9 | Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel..... | 51 |
| 3.7 | Pengolahan dan Analisa Data..... | 52 |
| 3.8 | Pelaporan Data..... | 52 |
| 3.9 | Definisi Operasional..... | 53 |
| 3.10 | Alur Penelitian..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 4. HASIL..... | 55 |
| 4.1 Ekstraksi Sampel..... | 55 |
| 4.2 Optimasi Pengukuran Aktivitas Spesifik Katalase..... | 55 |
| 4.2.1 Pengenceran Optimal H ₂ O ₂ | 55 |
| 4.2.2 Panjang Gelombang Maksimal..... | 55 |
| 4.2.3 Waktu Optimal..... | 55 |
| 4.2.4 Pengenceran Optimal Sampel Hati..... | 59 |
| 4.3 Aktivitas Katalase Sampel..... | 60 |
| 4.4 Kurva Standar Protein..... | 62 |
| 4.5 Aktivitas Spesifik Katalase Sampel..... | 63 |
| 4.6 Pengolahan Data dengan Uji Statistik..... | 67 |
| 5. PEMBAHASAN..... | 68 |
| 5.1 Optimasi Pengukuran..... | 68 |
| 5.2 Aktivitas Spesifik Katalase..... | 68 |
| 5.2.1 Aktivitas Spesifik Katalase pada Jaringan Hati Hipoksik dan Nonhipoksik..... | 68 |
| 5.2.1.1 Perbandingan Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol dan Perlakuan..... | 70 |
| 5.2.1.2 Perbandingan antar Kelompok Perlakuan..... | 72 |
| 5.3 Perbandingan dengan Hasil Penelitian Serupa pada Sampel Jaringan Ginjal..... | 73 |
| 5.4 Perbandingan dengan Hasil Penelitian Serupa pada Sampel Jaringan Jantung..... | 74 |
| 6. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 75 |
| 6.1 Kesimpulan..... | 75 |
| 6.2 Saran..... | 76 |
| DAFTAR REFERENSI..... | 78 |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

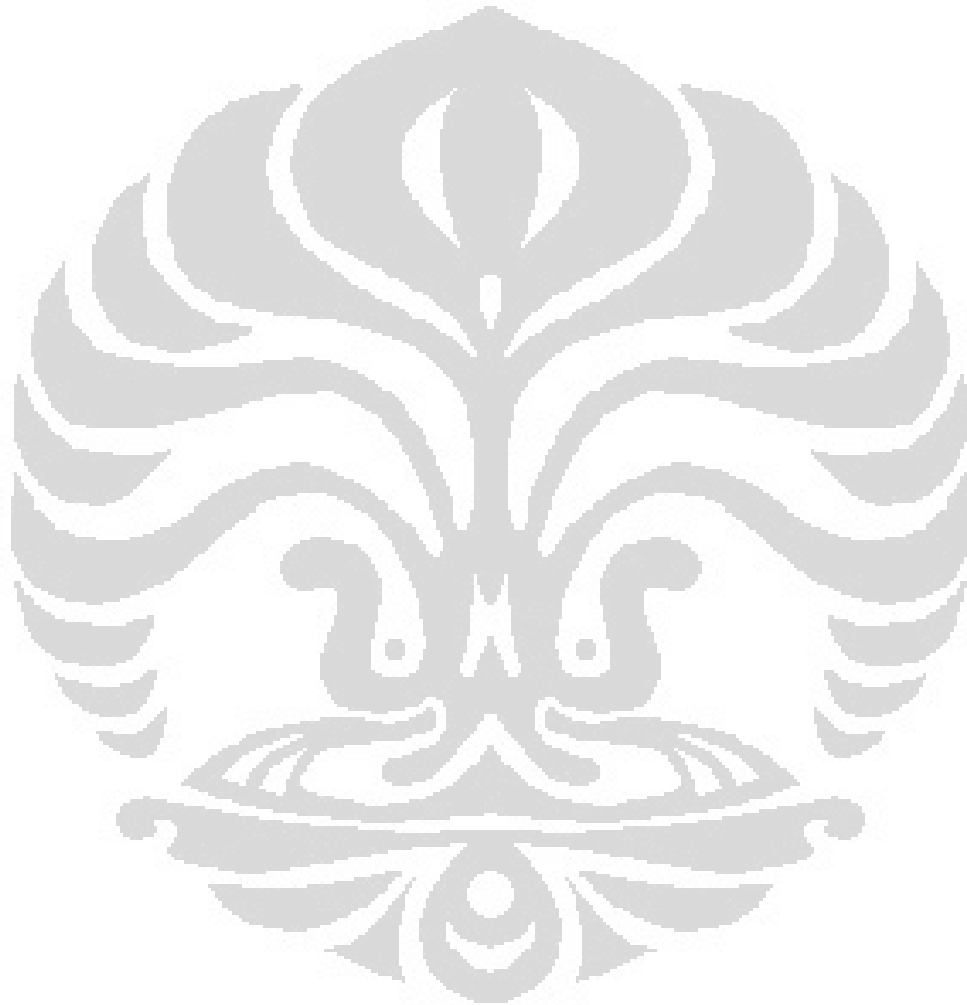
| | | |
|------------|---|----|
| Tabel 4.1. | Penguraian H_2O_2 oleh Blanko & Sampel tiap Satuan Waktu..... | 56 |
| Tabel 4.2. | Selisih Serapan Sampel dan Blanko pada Berbagai Pengenceran Sampel..... | 59 |
| Tabel 4.3. | Absorbansi Standar Protein (BSA) | 62 |
| Tabel 4.4. | Aktivitas Spesifik Katalase..... | 65 |



DAFTAR GAMBAR

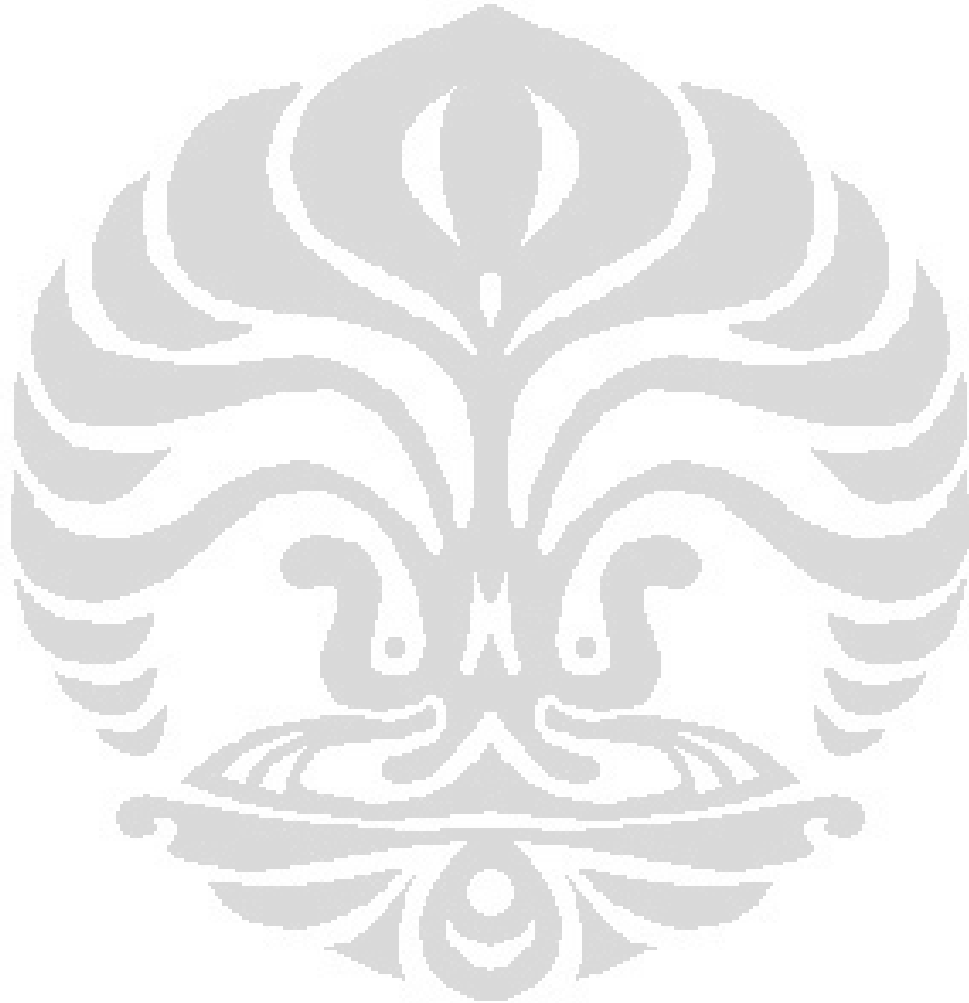
| | | |
|--------------|---|----|
| Gambar 2.1. | Anatomi Mikroskopik Hati..... | 7 |
| Gambar 2.2. | Struktur Tiga Dimensi hati..... | 8 |
| Gambar 2.3. | Bagan Efek Kerusakan Sel..... | 19 |
| Gambar 2.4 | Pembentukan Radikal Bebas pada Cedera Sel..... | 20 |
| Gambar 2.5. | Tabel Tekanan Barometrik dan Temperatur pada Berbagai Ketinggian menurut International Civil Aviation Organization..... | 22 |
| Gambar 2.6. | Grafik Hubungan Eksponensial Tekanan Barometrik terhadap Ketinggian..... | 23 |
| Gambar 2.7 | Grafik Hubungan antara Ketinggian, PAO ₂ , dan Saturasi Hemoglobin.. | 24 |
| Gambar 2.8. | Mekanisme Inflamasi yang Diinduksi oleh Ketinggian..... | 27 |
| Gambar 2.9. | Aktivitas Reduksi Senyawa Radikal Bebas oleh Enzim-enzim Antioksidan..... | 39 |
| Gambar 2.10. | Kerangka Konseptual..... | 41 |
| Gambar 3.1. | Profil Penerbangan pada Penelitian..... | 48 |
| Gambar 3.2. | Bagan Pembuatan Homogenat Jaringan..... | 49 |
| Gambar 3.3. | Bagan Alur Penelitian..... | 54 |
| Gambar 4.1. | Grafik Penguraian H ₂ O ₂ oleh Sampel & Blanko tiap Satuan Waktu..... | 57 |
| Gambar 4.2. | Grafik Penguraian H ₂ O ₂ oleh (S-B) pada tiap Satuan Waktu..... | 57 |
| Gambar 4.3. | Grafik Kecepatan Penguraian H ₂ O ₂ oleh Sampel tiap Satuan waktu..... | 58 |
| Gambar 4.4 | Grafik Penguraian H ₂ O ₂ pada Menit ke-1 (t ₀) hingga menit ke-2..... | 59 |
| Gambar 4.5. | Grafik Penguraian H ₂ O ₂ pada Menit ke-1 (t ₀) hingga menit ke-4..... | 60 |
| Gambar 4.6. | Kurva Standar Protein..... | 63 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Gambar 4.7. | Grafik Rata-rata Aktivitas Spesifik Katalase setiap Kelompok..... | 66 |
| Gambar 5.1. | Grafik Aktivitas Spesifik Katalase pada Jaringan Ginjal yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang..... | 73 |
| Gambar 5.2. | Grafik Aktivitas Spesifik Katalase pada Jaringan Jantung yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang..... | 74 |



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Analisa Gas Darah Arteri Tikus Percobaan



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Telah diketahui bahwa ketinggian menimbulkan stress pada berbagai sistem organ manusia. Tekanan atmosfer menurun pada ketinggian, sehingga terjadi penurunan tekanan parsial oksigen yang berimbas pada berkurangnya jumlah molekul udara yang dapat dihirup.¹⁻⁹ Saturasi hemoglobin darah menurun, dan berujung pada penurunan perfusi ke jaringan, suatu kondisi yang dikenal sebagai hipoksia.^{1-5,9,10} Pada ketinggian di atas 10,000 kaki, saturasi hemoglobin mulai mengalami penurunan dari nilai normalnya, 92-100%.¹⁻³

Tubuh memiliki mekanisme untuk mengkompensasi kurangnya oksigen di ketinggian. Pada kondisi kronik, sebagaimana didapatkan pada individu yang mendiami tempat-tempat tinggi, terjadi plastisitas jaringan, di antaranya peningkatan hematokrit, peningkatan saturasi darah arteri dan vena, serta peningkatan 2,3-bifosfoglisarat.¹²⁻¹⁴ Sedangkan pada hipoksia akut, saat individu yang tidak teraklimatisasi menuju ke ketinggian, disrupsi akut terhadap homeostasis tubuh menimbulkan konsekuensi pada 3 area utama, yaitu respon kardiovaskuler berupa peningkatan denyut jantung dan redistribusi suplai vaskuler ke jantung dan otak, respon respiratoris berupa hiperventilasi, serta efek neurologik.^{2,4,14,15} Pengetahuan mengenai efek hipoksia hipobarik terhadap sistem respirasi telah diterapkan untuk latihan atlet demi meningkatkan kapasitas fisik.^{14,15} Sedangkan efek neurologis hipoksia hipobarik dimanfaatkan pada latihan pengenalan akan hipoksia pada penerbang, sebuah prosedur yang telah rutin dilakukan di berbagai angkatan udara di dunia, tidak terkecuali di Indonesia.^{16,18}

Prosedur yang disebut terakhir sesungguhnya menggambarkan apa yang terjadi bila stress yang diberikan melebihi kemampuan jaringan untuk mengatasinya: munculnya manifestasi klinis. Berbagai faktor mempengaruhi munculnya yang diakibatkan proses hipoksia hipobarik akut ini, di antaranya ketinggian yang dicapai, laju kenaikan ke ketinggian (*rate of ascent*), serta durasi di ketinggian tersebut.^{2,19}

Pada tingkat sel, hipoksia mengakibatkan cedera sel melalui berbagai mekanisme, seperti deplesi energi yang berguna bagi metabolisme sel akibat penurunan fosforilasi oksidatif, gangguan fungsi enzim-enzim, kerusakan mitokondria, dan stress oksidatif yang menyebabkan gangguan fungsi pada tingkat organ.^{10,24-30}

Stress oksidatif merupakan salah satu penyebab terpenting pada kerusakan bahkan kematian sel.^{10,20-23} Stress oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan produksi dan eliminasi (*scavenging*) radikal bebas.²⁴⁻³⁰ Radikal bebas ialah atom, molekul, atau komponen yang sangat tak stabil konfigurasi atom atau molekularnya, akibat adanya satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan.²⁴⁻³⁰ Salah satu contoh radikal bebas ialah spesies oksigen reaktif yang secara fisiologis dibangkitkan secara konstan sebagai bagian dari reaksi reduksi-oksidasi selama proses metabolisme aerob. Sebagai mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas, sel memiliki sistem antioksidan, di antaranya enzim-enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, dan katalase.²⁴⁻³⁰

Pada hipoksia, terjadi peningkatan produksi spesies oksigen reaktif seperti seperti anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (-OH), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) dari sel parenkim dan endotel vaskuler yang hipoksik. Sel-sel hipoksik yang mengalami kerusakan melepas mediator-mediator inflamasi seperti interleukin (IL)-1 β , IL-6, dan *tumor necrosis factor* (TNF)- α yang bersifat kemotaktik terhadap sel-sel inflamatoris. Leukosit, terutama makrofag dan neutrofil yang bermigrasi ke lokasi inflamasi melepaskan spesies oksigen reaktif, meningkatkan akumulasinya pada area yang mengalami hipoksia.⁵

Bahwa hipoksia hipobarik terhadap peningkatan peroksidasi lipid, oksidasi protein, pemutusan rantai karbohidrat, hingga pemutusan rantai DNA pada berbagai jaringan telah banyak dibuktikan.^{10,24,25,28} Kapasitas sistem antioksidan enzimatik, yang tersusun atas superoksida dismutase, glutathion peroksidase, dan katalase menurun pada ketinggian.¹⁸

Selain itu, pada ketinggian didapati terjadinya stress reduktif, yang juga mengakibatkan peningkatan produksi radikal bebas oleh sistem transport elektron mitokondria, terutama pada kompleks I dan III. Pada hipoksia, terjadi penurunan

jumlah oksigen yang tersedia untuk direduksi menjadi H₂O pada sitokrom oksidase. Terjadi akumulasi ekuivalen pereduksi yang menginduksi auto-oksidasi kompleks mitokondria dan membangkitkan spesies oksigen reaktif.^{18,43}

Akan tetapi, hipoksia bukan faktor induksi tunggal terjadinya stress oksidatif pada ketinggian. Berbagai faktor lain diduga berperan sebagai sumber potensial pembentukan pro-oksidan yang menyebabkan peningkatan stress oksidatif, di antaranya penurunan tekanan atmosfer, tekanan oksigen, temperatur, kelembaban, dan partikel debu, serta peningkatan dalam hal intensitas radiasi ultraviolet.^{1,18,16,38}

Hati mungkin merupakan salah satu organ yang paling sensitif terhadap stress oksidatif yang diinduksi oleh ketinggian.^{18,22} Gangguan homeostasis sistem oksidan-antioksidan pada hati terjadi baik akibat peningkatan produksi spesies oksigen reaktif maupun penurunan kapasitas sistem pertahanan terhadap oksidan. Hipoksia, jenis hipobarik khususnya, memicu peningkatan peroksidasi lipid di hati, sementara enzim-enzim antioksidan hati mengalami penurunan aktivitas.^{18,20-23,41} Sementara organ ini merupakan pusat metabolisme tubuh yang berperan besar dalam pembentukan energi, interkonversi karbohidrat, protein, lemak, dan kolesterol, fungsi absorpsi nutrisi, detoksifikasi komponen xenobiotik dan toksin, hingga fasilitasi fungsi koagulasi darah, sistem hormon, dan pengaturan tekanan darah melalui produksi berbagai protein plasma.^{2,3,5,6} Selain itu, pada ketinggian terjadi penurunan suhu yang memicu produksi panas ekstra, sehingga terjadi proses glikogenolisis untuk mensuplai kebutuhan glukosa, sehingga hati memegang peran penting dalam proses adaptasi terhadap ketinggian.⁴⁰

Katalase merupakan bagian dari sistem pertahanan enzimatik terhadap radikal bebas. Enzim ini mengkatalisis konversi hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen. Katalase terutama terdapat dalam peroksisom, dan sedikit di dalam fraksi sitosol dan mikrosom sel.²⁴⁻³⁰ Pada hati tikus, katalase juga terdapat di dalam mitokondria. Peroksisom juga kaya akan oksidase yang menghasilkan H₂O₂; organel ini merupakan salah satu bentuk mekanisme pertahanan kompartemensi terhadap radikal bebas.^{24,25}

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Mulyawan (2009) mengenai efek hipoksia hipobarik akut berulang terhadap ekspresi gen *hypoxic-*

induced factor (HIF)-1 α dan peningkatan densitas mikrovaskuler pada otak tikus. Induksi hipoksia hipobarik dilakukan dengan alat simulasi *hypobaric chamber training* dengan protokol serupa dengan protokol untuk penerbang militer Tentara Nasional Indonesia-Angkatan Udara (TNI-AU). Penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Mulyawan (2009) mengenai efek hipoksia hipobarik pada jaringan hati tikus memperlihatkan penurunan aktivitas katalase.^{20-23,30,41} Namun, belum terdapat penelitian yang dilakukan dengan metode serupa, yang mengkombinasikan efek ketinggian yang sangat tinggi, serta *rate of ascent* yang cepat, yang menyebabkan hipoksia akut, dan dilakukan berulang, yang serupa dengan prosedur yang dilakukan bagi penerbang militer TNI AU.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah hipoksia hipobarik akut berulang menyebabkan perubahan aktivitas spesifik katalase hati yang signifikan.

1.2 Rumusan Masalah

Uraian dalam latar belakang yang tersebut di atas, menjadi dasar bagi peneliti untuk merumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

“Apakah terdapat perubahan aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang?”

1.3 Hipotesis Penelitian

Rumusan masalah tersebut di atas, menjadi dasar bagi peneliti untuk merumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

“Terdapat perubahan aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati pada tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang.”

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mengetahui gambaran tentang aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang.

1.4.2 Tujuan Khusus

Mengukur aktivitas spesifik katalase dari jaringan hati tikus hipoksia hipobarik akut berulang secara spektrofotometri.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat bagi peneliti

1. Mengetahui aktivitas spesifik katalase dari jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik intermiten berulang.

1.5.2 Manfaat bagi perguruan tinggi

1. Pengejawantahan tridarma perguruan tinggi sebagai lembaga penyelenggara pendidikan, penelitian dan pengabdian bagi masyarakat.
2. Meningkatkan hubungan kerjasama dan saling pengertian antara pendidik dan mahasiswa.
3. Meningkatkan kualitas penelitian perguruan tinggi dalam rangka menyukseskan pencapaian visi misi FKUI terkemuka 2010.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1. Hati

Hati merupakan kelenjar terbesar pada tubuh manusia, dengan berat sekitar 1500 gram atau 2.5% dari total berat tubuh manusia dewasa. Organ ini terletak di kuadran kanan atas rongga abdomen, di bawah diafragma.³¹⁻³⁶ Di rongga perut, organ ini sebagian besar dilapisi oleh peritoneum.^{31,32}

2.1.1 Anatomi

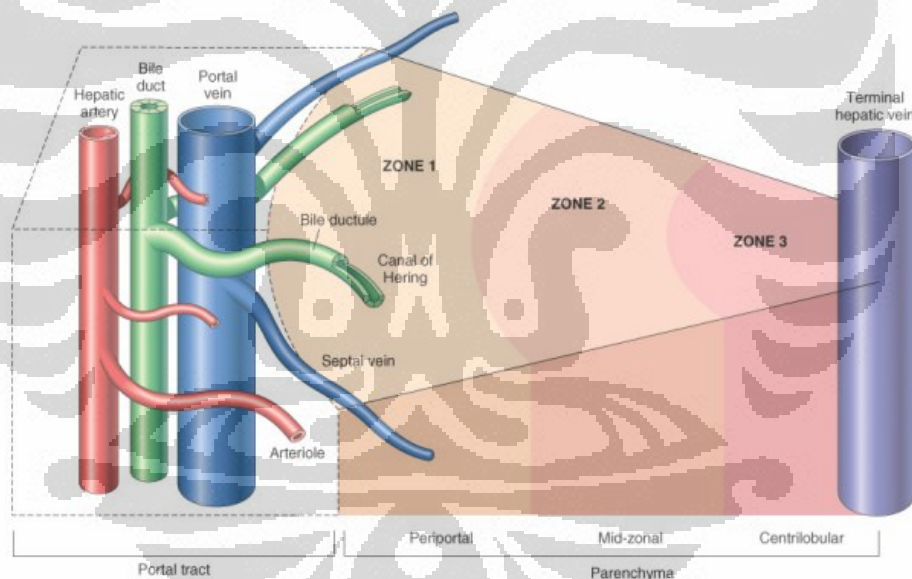
Hati terbagi atas 4 lobus—kanan, kiri, kuadratus, dan kaudatus, yang dipisahkan oleh ligamentum fasciformis.^{31,32} Seluruh permukaan hati dilapisi oleh kapsul Glisson, jaringan ikat padat ireguler yang melekat longgar pada seluruh permukaan hati, kecuali pada area porta hepatica.³² Porta hepatica yang terletak pada permukaan inferior hati merupakan saluran tempat masuknya pembuluh-pembuluh darah yang mendarahi, di samping tempat keluar duktus hepaticus dekstra dan sinistra yang menyalurkan empedu ke kandung empedu.³¹⁻³⁴ Hati memiliki suplai darah ganda, yang berasal dari v. porta hepatica (75%) dan a. hepatica dekstra dan sinistra (25%).^{31,32,37} V. porta hepatica membawa nutrisi yang diserap dari saluran cerna ke hati, yang kemudian mengambil, menyimpan, dan mendistribusikan nutrisi dan vitamin.³¹⁻³⁷ Darah meninggalkan hati melalui permukaan posteriornya melalui vena hepatica, yang menyalurkan darah ke v. cava inferior. Pada keadaan istirahat, hati menerima 25% suplai darah dari jantung.³⁴

2.1.2 Mikroarsitektur

Secara anatomis klasik, jaringan hati terbagi-bagi menjadi lobulus-lobulus berbentuk heksagonal berdiameter 1-2 mm yang berpusat pada v. hepatica terminalis. Pada struktur klasik ini, traktus portalis (trias Glisson) yang berisi a. hepatica, v. porta, dan duktus biliaris terletak pada bagian perifer lobulus.^{31,32,35,37} Hepatosit yang berada di sekitar v. hepatica terminalis disebut sebagai hepatosit sentrilobuler (sentrolobuler), sedangkan yang berada dekat traktus portalis disebut sebagai hepatosit periportal.

Secara fisiologis, jaringan hati terbagi menjadi unit-unit fungsional berbentuk segitiga yang dikenal sebagai asinus hati. Sebuah asinus hati tersusun atas 3 traktus portalis, masing-masing terletak di sudut “segitiga” asinus, dan sebuah v. sentralis di pusatnya.³²

Hepatosit di area dekat v. hepatica terminalis terletak paling jauh dari suplai darah, dan karenanya berada di apeks distal dari asinus hati, sedmangkan basis asinus dibentuk oleh venula septal yang berasal dari traktus portalis yang mempenetrasi jaringan hati. Di dalam asinus, parenkim dibagi menjadi 3 (tiga) zona, dengan zona 1 terletak paling dekat dengan suplai vaskuler dari traktus portalis, zona 3 di sekeliling v. hepatica, dan zona 2 berada di antaranya. Zonasi ini terbagi secara metabolik, karena adanya gradien aktivitas lobuler untuk enzim-enzim hati. Selain itu, berbagai bentuk kerusakan hati juga memiliki distribusi berdasarkan zona.³⁵

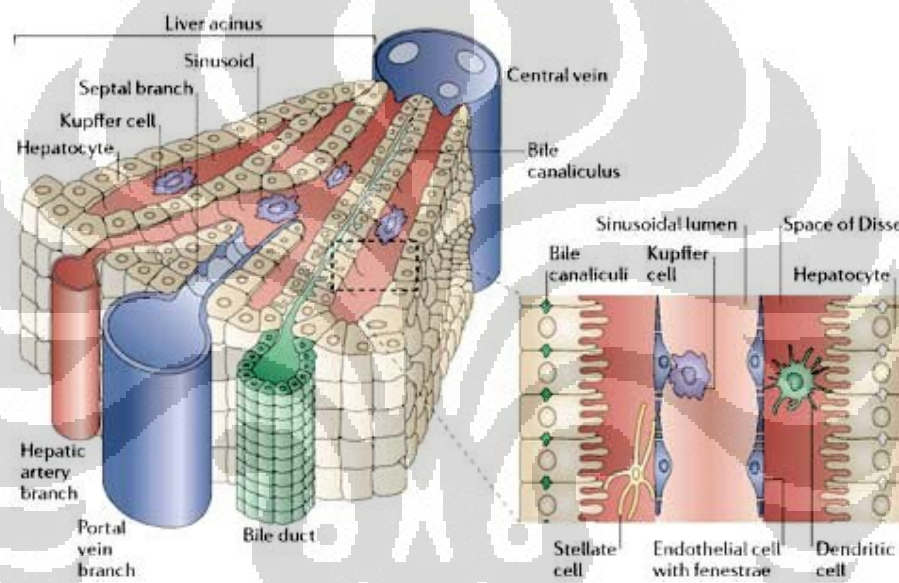


Gambar 2.1. Anatomi Mikroskopik Hati

Sumber: Crawford JM. Liver and biliary tract. In: Abbas VK, Abbas AK, Fausto N, editors. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

Parenkim hati tersusun atas lempeng-lempeng hepatosit yang saling beranastomosis. Hepatosit yang berbatasan langsung dengan traktus portalis

disebut sebagai lempeng pembatas (*limiting plate*), yang membentuk batas inkotinu di sekeliling mesenkim traktus portalis. Hepatosit tersusun radial di sekeliling v. hepatica terminalis. Di antara jalinan hepatosit, terdapat sinusoid vaskuler. Darah melewati sinusoid kemudian menuju v. hepatica terminalis. Setiap hepatosit berada di antara sinusoid dengan pendarahan yang berasal dari v porta hepatica dan a. hepatica.^{32,35} Sistem pendarahan ganda ini menjadikan hepatosit salah satu sel yang paling kaya perfusi sekaligus tahan terhadap iskemia.^{34,35-37}



Gambar 2.2. Struktur Tiga Dimensi Hati

Sumber: <http://www.tracy.k12.ca.us/thoadvbio/images/sinusoid.gif>

Sinusoid dilapisi oleh sel-sel endotelial yang berpori dan inkontinu, yang membatasi celah ekstrasinuoidal, celah Disse. Ke dalam celah Disse, mikrovilli hepatosit berprotrusi.^{31,32,34-36} Tersebar dan menempel di permukaan luminal sel-sel endotelial adalah sistem fagosit monosit yang dikenal sebagai sel-sel Kupffer.³¹⁻³⁷ Di celah Disse banyak terdapat sel-sel stelata perisinusoidal yang berperan dalam penyimpanan dan metabolisme vitamin A.³² Jika terjadi proses

inflamasi pada parenkim hati, sel-sel stelata ini berubah menjadi myofibroblast yang memproduksi kolagen.³²

Di antara hepatosit terdapat kanalikuli empedu, dibentuk oleh membran plasma hepatosit yang saling berhadapan dan dipisahkan dari ruang sinusoid oleh taut kedap.³¹⁻³⁷ Banyak mikrovilli yang berprotrusi ke dalam celah interseluler ini. Mikrofilamen aktin dan myosin hepatosit di sekeliling kanalikuli membantu mendorong cairan empedu yang disekresikan hepatosit di sepanjang kanalikuli. Saluran empedu ini berjalan menuju kanalis Hering pada regio periporta, di mana sekret empedu kemudian memasuki duktus biliaris terminal di traktus portalis.^{32,34,35}

2.1.3 Fungsi

Hati dapat merupakan pusat metabolisme tubuh dengan fungsi yang sangat beragam, yaitu:

1. Pembentukan energi dan interkonversi substrat.³¹⁻³⁷

a. Metabolisme karbohidrat

Glukosa dari asupan makanan masuk ke hati melalui v. porta hepatica, di mana sel-sel hati kemudian mengambil, mengkonversinya menjadi glikogen. Hati juga berperan dalam glikogenolisis dan glukoneogenesis.³²⁻³⁷

b. Metabolisme protein

Hati merupakan tempat utama proses deaminasi dan transaminasi oksidatif, di mana terjadi pemindahan gugus-gugus asam amino antar molekul untuk menghasilkan substrat bagi metabolisme karbohidrat dan sintesis asam amino.³²⁻³⁷

c. Metabolisme lipid

2. Sintesis dan sekresi protein-protein plasma

Hati memproduksi dan mensekresi banyak protein yang menyusun konstituen plasma darah, termasuk albumin, faktor-faktor pembekuan darah, protein-protein pengikat hormon dan obat, dan juga beberapa hormon maupun prekursornya. Oleh karena fungsi ini, hati berperan penting dalam mempertahankan tekanan onkotik plasma melalui sintesis

albumin, memfasilitasi koagulasi darah melalui sintesis dan modifikasi protein-protein pembekuan darah, fungsi pengaturan tekanan darah melalui produksi angiotensinogen, pertumbuhan melalui produksi *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), dan metabolisme hormon melalui produksi *steroid hormone-binding globulin* (SHBG) dan *thyroid-binding globulin* (TBG).

3. Solubilisasi, transport, dan penyimpanan

a. Sirkulasi enterohepatik asam empedu

Hati mensintesis dan mensekresikan asam empedu yang berperan dalam solubilisasi. Fungsi solubilisasi berperan dalam absorpsi zat-zat nutrisi (lipid, vitamin larut lemak) serta ekskresi (kolesterol, bilirubin, metabolit xenobiotik).

b. Inaktivasi & detoksifikasi komponen dan metabolit xenobiotik

Xenobiotik merupakan komponen yang tidak memiliki nilai gizi dan memiliki potensi toksik.^{24,34,36} Obat merupakan salah satu contoh komponen xenobiotik.²⁴ Komponen ini kemudian akan diekskresikan oleh ginjal, namun untuk proses eliminasi yang efektif, komponen ini perlu diubah menjadi hidrofilik (larut dalam air). Proses konversi menjadi komponen hidrofilik ini dilakukan oleh hati.^{24,34}

Proses konversi initerjadi dalam 2 tahap yang dikatalisasi oleh enzim-enzim yang berbeda. Pada reaksi fase I, komponen asal ditransformasi menjadi komponen yang lebih polar dengan pemberian satu atau lebih. Sebagian besar reaksi fase I melibatkan proses oksidasi, dengan enzim-enzim yang terlibat sebagian besar terletak di dalam retikulum endoplasma (RE) halus, dan sebagian terletak di sitoplasma. Enzim yang terlibat pada reaksi fase I biotransformasi obat merupakan kompleks enzim yang tersusun atas NADPH-sitokrom P450 reduktase dan serangkaian hemoprotein yang disebut sebagai sitokrom P450. Obat dikombinasikan dengan sitokrom P450 yang teroksidasi untuk membentuk kompleks sitokrom P450₃-obat. Kompleks ini kemudian mengalami reduksi menjadi kompleks sitokrom P450₂-obat dengan NADPH-sitokrom P450 reduktase

sebagai katalisator. Kompleks tereduksi kemudian dikombinasikan dengan molekul oksigen untuk membentuk intermediat oksigen. Satu atom dari molekul oksigen kemudian dikombinasikan dengan 2 atom hidrogen dan 2 elektron untuk membentuk molekul air. Atom oksigen lain tetap terikat dengan kompleks sitokrom P450-obat dan ditransfer dari sitokrom P450 ke molekul obat. Produk obat dengan atom oksigen yang terinkorporasi padanya dilepaskan dari kompleks tersebut. Sitokrom P450₃ dapat didaur ulang untuk proses oksidasi molekul obat lain.²⁴

Pada reaksi fase II, produk reaksi fase I mengalami konjugasi dengan beberapa komponen untuk menjadikan produk tersebut lebih hidrofilik. Konjugasi sebagian besar dengan asam glukuronat sebagai substansi, dengan glukuroniltransferase sebagai katalisator. Molekul lain yang digunakan dalam proses konjugasi di antaranya glisin, taurin, dan sulfat.²⁴

c. Solubilisasi lipid

Melalui produksi dan eksport-import berbagai apolipoprotein, hati berperan dalam transport lipid dari saluran cerna ke hati dan jaringan serta dari jaringan ke hati, serta impor kolesterol dari jaringan ke hati. Berbagai lipoprotein yang berperan dalam transport lemak di antaranya kilomikron *very low-density lipoprotein* (VLDL), *low-density lipoprotein* (LDL), serta *high-density lipoprotein* (HDL).³⁶

d. Produksi protein-protein pengikat

Selain protein-protein pengikat hormon, hati juga berperan mensintesis dan mensekresi transferrin, protein pengikat besi.³⁶

4. Proteksi dan Pembersihan

a. Fungsi fagositik dan endositik sel-sel Kupffer

Hati merupakan lini pertahanan terakhir sistem gastrointestinal terhadap mikroorganisme patogen. Peran ini dijalankan hati melalui fungsi monosit hati, sel Kupffer.^{31,32,35,36}

b. Fungsi endositik hepatosit

Hepatosit memiliki beberapa reseptor spesifik bagi protein plasma yang rusak yang berbeda dari reseptor yang terdapat di permukaan sel-sel Kupffer.³⁶

c. Metabolisme ammonia

Ammonia dibentuk dari deaminasi asam amino yang dimetabolisme di dalam hepatosit menjadi substansi urea yang kurang toksik.^{24,36}

d. Sintesis glutathion oleh hati

Glutathion merupakan reagen reduksi sitoplasma utama yang berfungsi mereduksi spesies oksigen reaktif, khususnya hidrogen peroksida. Hati mungkin juga mengekspor glutathion untuk digunakan oleh jaringan lain.

2.1.4 Kerusakan

Terlepas dari penyebabnya, pada kerusakan hati terdapat 5 (lima) respon umum yang terjadi, yaitu:

1. Degenerasi dan Akumulasi Intraseluler

Kerusakan akibat agen toksik atau imunologik dapat menyebabkan pembengkakan hepatosit. Pembengkakan sel yang moderat bersifat reversibel. Dengan semakin beratnya kerusakan, terjadi degenerasi balon (*ballooning degeneration*), di mana hepatosit yang membengkak dengan organel sitoplasmik terkumpul dan terbentuk ruang yang terbebas dari organel. Ruang ini dapat terisi oleh material empedu (*feathery degeneration*) atau droplet lemak trigliserida (*steatosis*). *Steatosis* dapat terdiri dari *steatosis mikrovessikuler* yang tidak menggeser inti, hingga *steatosis makrovessikuler* yang merupakan droplet tunggal besar yang menggeser inti hepatosit, biasanya terjadi pada hepatosit penderita obesitas, diabetes mellitus, atau konsumsi alkohol kronik.³⁵

2. Nekrosis & Apoptosis

Gangguan berbagai agen dapat menyebabkan nekrosis hepatosit. Hepatosit dalam mengalami nekrosis koagulatif, biasanya terjadi akibat

iskemia, atau nekrosis litik yang merupakan hasil dari degenerasi balon. Hepatosit juga dapat mengalami apoptosis, di mana hepatosit berkumpul membentuk sel-sel yang mengkerut, piknotik, dengan inti terfragmentasi.³⁵

Nekrosis biasanya memiliki distribusi zona tertentu. Nekrosis paling jelas tampak jika terjadi segera pada hepatosit yang terletak di sekitar vena hepatica terminalis. Nekrosis ini disebut sebagai nekrosis sentrilobuler, sebuah cedera yang merupakan khas terjadi pada cedera iskemik dan sejumlah reaksi akibat toksin atau obat. Nekrosis midzonal atau periportal murni jarang terjadi. Nekrosis dapat terbatas pada sel-sel yang terdapat dalam lobus-lobus hepar atau pada sel-sel yang terletak di antara parenkim periportal dan traktus portal yang mengalami inflamasi (hepatitis interfase). Dengan semakin beratnya inflamasi, nekrosis dapat meluas ke lobus di dekat lobus yang mengalami inflamasi tersebut, menyebar secara portal ke portal, portal ke sentral, atau sentral ke sentral (nekrosis jembatan, *bridging necrosis*). Jika terjadi nekrosis luas yang mengenai seluruh lobus (nekrosis submasif) hingga sebagian besar (nekrosis masif) biasanya diikuti oleh gagal hati.³⁵

3. Inflamasi

Cedera pada suatu jaringan mengundang akan mengundang efektor-efektor inflamasi menuju lokasi tersebut. Inflamasi akibat pada hepatosit, baik toksik maupun iskemik, akan mengundang reaksi inflamasi, menyebabkan penghancuran sel-sel hati yang mengekspresikan antigen oleh sel T limfositik, menyebabkan hepatitis dan dapat berujung pada kerusakan hati. Reaksi ini biasanya terjadi pada proses inflamasi akibat infeksi viru.³⁵

4. Regenerasi

Sel-sel hati memiliki jangka hidup yang panjang, dan tingkat proliferasi sebagai respon terhadap reseksi jaringan atau kematian sel yang tinggi.^{32,35} Jika terjadi nekrosis hepatoseluler dengan bangunan jaringan ikat yang intak, restitusi struktur hatri yang hampir sempurna dapat terjadi, bahkan meskipun nekrosis bersifat masif atau submasif.³⁵

5. Fibrosis

Jaringan fibrosis terbentuk sebagai respon terhadap inflamasi atau cedera akibat toksin. Fibrosis menuju kerusakan hati yang ireversibel. Dengan

semakin progresifnya proses fibrosis, jaringan hati menjadi terbagi-bagi menjadi nodul-nodul hepatosit yang berproliferasi dikelilingi jaringan parut, yang dinamakan sirosis.³⁶

2.1.5 Manifestasi Gangguan Fungsi Hati

Manifestasi klinis gangguan fungsi hepatosit ialah sebagai berikut:

1. Penurunan pembentukan energi & interkonversi substrat

a. Metabolisme karbohidrat

Penyakit hati berat dapat mengakibatkan hipo- atau hiperglikemia. Hipoglikemia terjadi bila terdapat penurunan massa hepatosit fungsional, sedangkan hiperglikemia merupakan akibat dari pirau portal-ke-sistemik yang menurunkan ekstraksi postprandial glukosa dari darah portal.^{36,37}

b. Metabolisme lipid

Gangguan metabolisme lipid dapat menyebabkan sindroma akumulasi lemak di hati yang terjadi pada fase awal cedera hati. Hal ini mungkin disebabkan langkah perakitan partikel lipoprotein untuk eksport kolesterol dan trigiserida yang kompleks lebih sensitif terhadap disrupsi dibanding jalur sintesis lipid. Gangguan fungsi tersebut menyebabkan penumpukan lemak yang tidak dapat dieksport dalam bentuk *very low-density lipoprotein* (VLDL).³⁶

c. Metabolisme protein

Gangguan metabolisme protein di hati dapat menyebabkan sindroma perubahan status mental dan konfusio yang dikenal sebagai ensefalopati hepatic.³⁵

2. Hilangnya fungsi solubilisasi dan penyimpanan

a. Gangguan sekresi empedu

Kerusakan pada hepatosit dapat menyebabkan kegagalan sekresi empedu, kolestasis, yang menyebabkan kegagalan fungsi pelarutan substansi seperti lipid dan vitamin larut lemak, yang berujung pada malabsorpsi dan defisiensi gizi. Fungsi solubilisasi empedu, selain berfungsi mengabsorpsi substansi-substansi yang berasal dari

asupan, juga memiliki fungsi ekskresi. Gangguan ekskresi substrat menyebabkan penumpukan substrat, seperti bilirubin, yang bermanifestasi pada ikterus. Kadar substrat tersebut dapat mencapai tingkat toksik, menyebabkan gangguan fungsi organ-organ lain, seperti akumulasi bilirubin yang toksik terhadap sistem saraf pusat, menyebabkan kern-ikterus terutama pada neonatus. Akumulasi asam empedu sebagai produk hasil konversi dari kolesterol menyebabkan deposisinya pada kulit dan menimbulkan pruritus.³

b. Gangguan detoksifikasi obat

Gangguan fungsi hepatosit mengganggu fungsi enzim-enzim intraseluler, termasuk sitokrom oksidase yang berperan penting dalam metabolisme berbagai obat dan toksin. Gangguan metabolisme obat dapat menyebabkan toksisitas karena kadar zat aktif yang tetap tinggi dalam darah. Reaksi metabolisme fase I juga banyak mengkonversi komponen yang relatif tidak berbahaya menjadi komponen yang lebih reaktif dan karenanya semakin toksik. Peningkatan reaktivitas oleh reaksi fase I secara fisiologis berfungsi memfasilitasi metabolisme fase 2, sehingga reaksi di fase II berlangsung lebih efisien.^{24,25,34,36} Akan tetapi, pada kondisi tertentu di mana terjadi gangguan pada reaksi fase II (misal: defisiensi glutathione akibat nutrisi yang inadeguat), aktivitas fase I yang terus berlangsung dapat memicu terjadinya kerusakan hati.³⁶

c. Gangguan dinamika lipoprotein dan dislipidemia

Pada penyakit hati yang didapat, kolesterol serum meningkat bila terjadi obstruksi traktus biliaris, dan menurun bila terjadi kerusakan hepatosit (sirosis), mengakibatkan malabsorpsi lemak yang mengakibatkan penurunan ambilan kolesterol dari saluran cerna.³⁶

d. Perubahan fungsi pengikatan dan penyimpanan hati

Pasien dengan penyakit hati memiliki resiko tinggi mengalami keadaan defisiensi (*deficiency state*) seperti defisiensi asam folat, vitamin B₁₂, dan vitamin A karena gangguan fungsi penyimpanan hati.³⁶

3. Penurunan sintesis dan sekresi protein-protein plasma

Signifikansi klinis fungsi sintesis dan sekresi protein-protein plasma bergantung pada luasnya fungsi protein tersebut. Sebagai contoh, albumin merupakan konstituen utama protein darah, dan gangguan fungsi hati dapat menyebabkan hipoalbuminemia. Gangguan fungsi hati juga dapat berakibat pada peningkatan kadar hormon aktif darah, gangguan koagulasi darah, tekanan darah, pertumbuhan, dan metabolisme lemak.^{24,36}

4. Gangguan fungsi proteksi dan pembersihan

a. Pembersihan bakteri dan endotoksin

Pembersihan bakteri oleh makrofag hati sel-sel Kupffer merupakan lini terakhir pertahanan sistem gastrointestinal terhadap mikroorganisme patogen. Pada pasien dengan penyakit hati berat, infeksi dapat dengan cepat menjadi sistemik dan menyebabkan sepsis.^{36,37}

b. Perubahan metabolisme amonia

Gangguan detoksifikasi amonia dapat menyebabkan akumulasi amonia yang bersifat toksik terhadap sistem saraf pusat, menyebabkan ensefalopati hepatic.^{33,34,36,37}

c. Perubahan pembersihan hormon

Pada keadaan normal, hati membersihkan darah dari fraksi hormon steroid yang tidak terikat pada protein pengikatnya, SHBG. Steroid bebas ini diambil oleh hati, kemudian mengalami oksidasi dan konjugasi, kemudian diekskresikan ke saluran empedu, di mana sebagian mengalami resirkulasi enterohepatik. Pada gangguan fungsi hati akibat kerusakan pada hepatosit, terjadi penurunan pembersihan hormon steroid, dan konversi enzimatik androgen menjadi estrogen (aromatisasi perifer) meningkat. Efeknya ialah peningkatan kadar estrogen darah, yang kemudian mengubah sintesis dan sekresi protein hepatosit dan aktivitas mikrosom P450. Sintesis protein-protein hepatic tertentu meningkat, sementara sintesis sebagian lainnya menurun. Aktivitas enzim sitokrom P450 meningkat karena hati berupaya mengkompensasi peningkatan kadar estrogen dengan

meningkatkan metabolisme. Terjadi supresi gonad (pada pria menyebabkan feminisasi) dan adrenal.³⁶

5. Gangguan keseimbangan natrium dan air

Gangguan fungsional hepatosit dapat menyebabkan penurunan sintesis albumin, mengubah tekanan onkotik plasma dan mungkin akibat peningkatan nitrit oksida, sehingga volume intravaskuler dipersepsikan tidak adekuat, dan mengaktivasi mekanisme retensi garam yang melibatkan sekresi aldosteron diikuti retensi air akibat sekresi vasopressin.³⁶

2.2 Hipoksia

2.2.1 Definisi

Hipoksia merupakan keadaan di mana terjadi defisiensi oksigen, yang mengakibatkan kerusakan sel akibat penurunan respirasi oksidatif sel.^{2,5-12}

Hipoksia merupakan penyebab penting dan umum dari cedera dan kematian sel. Tergantung pada beratnya hipoksia, sel dapat mengalami adaptasi, cedera, atau kematian.¹⁰

2.2.2 Klasifikasi

Hipoksia dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, di antaranya:

1. Hipoksia hipoksik

Terjadi akibat oksigenasi darah dari paru-paru yang tidak adekuat karena kurangnya jumlah molekul oksigen pada udara yang dihirup, misal pada ketinggian dan udara yang terkontaminasi.^{2,11}

2. Hipoksia patologik

Terjadi akibat oksigenasi darah dari paru-paru yang tidak adekuat karena defek pada difusi oksigen dari paru-paru ke darah meskipun jumlah molekul oksigen di udara adekuat.^{2,11}

3. Hipoksia hipemik

Hipoksia akibat penurunan kapasitas pengangkutan oksigen oleh sel darah merah. Dapat disebabkan oleh anemia, kehilangan darah akut

maupun kronik, keracunan karbon monoksida, serta efek senyawa golongan nitrit dan sulfat.^{2,11}

4. Hipoksia stagnan

Terjadi akibat tidak adekuatnya sirkulasi, meskipun kapasitas pengangkutan oksigen oleh darah normal. Penyebabnya antar lain gagal jantung, spasme arteri, dan pengumpulan darah di vena (*venous pooling*) pada proses turun dari ketinggian (*descending, positive-G maneuver*).²

5. Hipoksia histotoksik

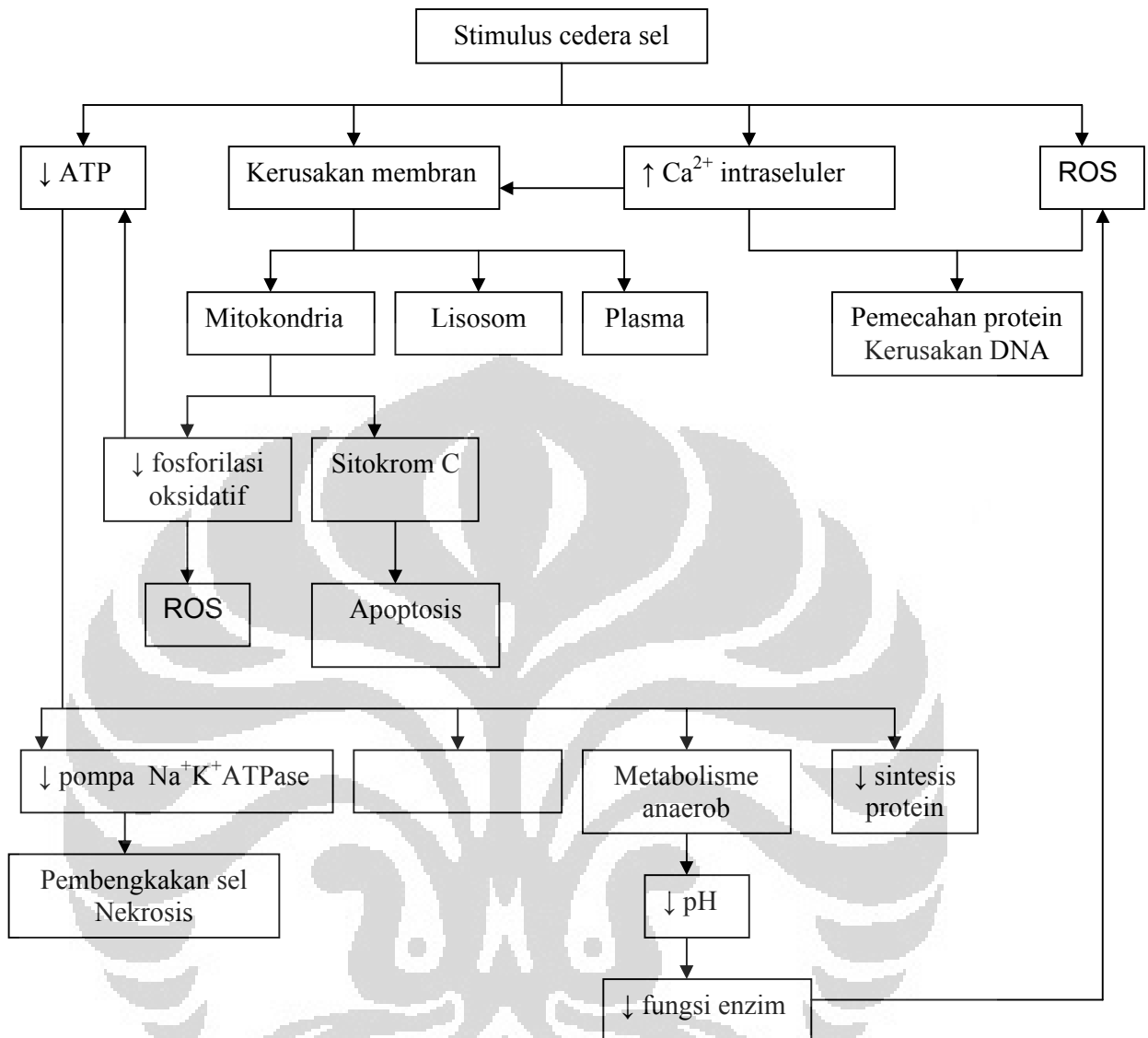
Hipoksia yang disebabkan gangguan utilisasi oksigen oleh jaringan. Dapat disebabkan oleh intoksikasi alkohol, narkotik, serta toksin seperti sianida.^{2,11}

2.2.3 Efek

2.2.3.1 Efek pada Tingkat Seluler

Pada level seluler, hipoksia dapat menginduksi mekanisme adaptasi, kerusakan, hingga kematian sel.¹⁰ Kerusakan dan kematian sel terjadi melalui mekanisme-mekanisme sebagaimana dijelaskan dalam gambar 2.3.

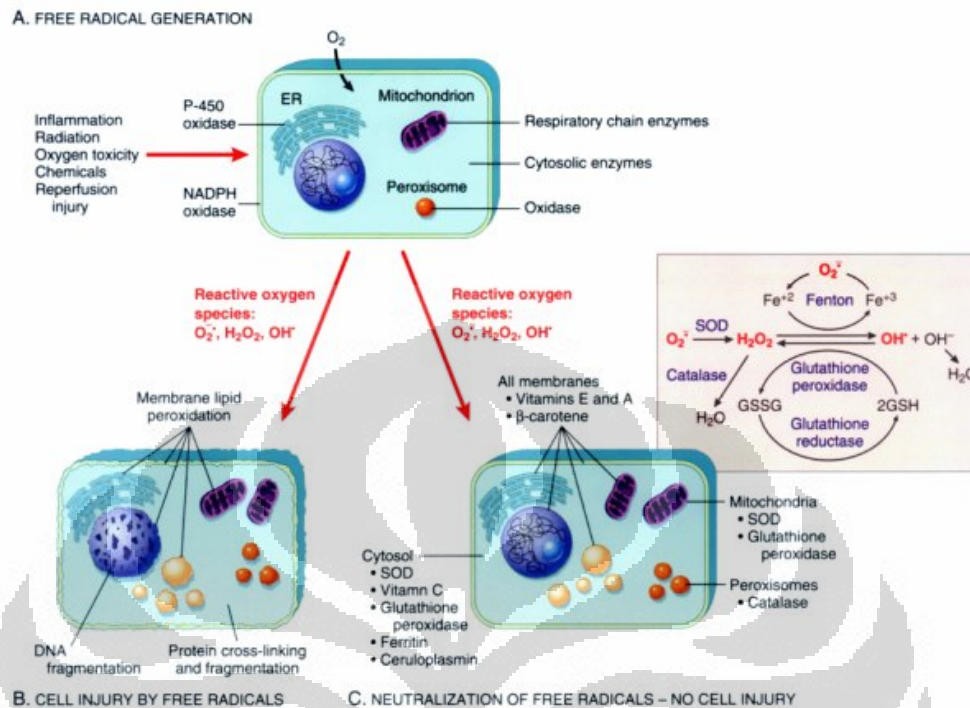
Sel menghasilkan energi melalui reduksi molekul O₂ menjadi H₂O. Dalam proses metabolisme normal, molekul-molekul oksigen reaktif yang tereduksi dihasilkan dalam jumlah kecil sebagai produk sampingan respirasi mitokondrial. Molekul-molekul oksigen reaktif tereduksi ini dikenal sebagai spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS). Sel memiliki mekanisme pertahanan untuk mencegah kerusakan akibat molekul ini, yang dikenal sebagai sistem antioksidan. Ketidakseimbangan antara proses pembentukan dan eliminasi (*scavenging*) radikal bebas berakibat pada stress oksidatif. Pada hipoksia, gangguan homeostasis ini dapat terjadi melalui kedua mekanisme. fungsi enzim-enzim antioksidan seperti superoksida dismutase, hidrogen peroksidase, katalase menurun akibat penurunan pH sel dan fungsi DNA.¹⁰



Gambar 2.3. Bagan Efek Kerusakan Sel

Sumber: Kumar V, Abbas AA, Fausto N, editors. Robins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 14-16. Telah diolah kembali.

Produksi spesies oksigen reaktif meningkat. Spesies oksigen reaktif ini berasal dari sel-sel parenkim jaringan, endotel vaskuler, ataupun dari leukosit yang menginfiltrasi karena terjadinya inflamasi. Anion superoksida dapat diproduksi sebagai hasil dari proses reduksi oksigen yang tidak sempurna oleh mitokondria yang mengalami kerusakan atau akibat aktivitas oksidase sel-sel parenkim, endotel, maupun leukosit.¹⁰



Gambar 2.4. Pembentukan Radikal Bebas pada Cedera Sel

Sumber: Kumar V, Abbas AA, Fausto N, editors. Robins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

Hipoksia menginduksi inflamasi melalui pelepasan mediator-mediator inflamasi oleh sel parenkim maupun endotel yang hipoksik.² Neutrofil sebagai salah satu efektor inflamasi akut bekerja dengan membangkitkan radikal bebas.

2.2.3.2 Efek pada Tingkat Organ

Telah diketahui bahwa hipoksia menyebabkan penurunan fosforilasi oksidatif yang mengakibatkan penurunan produksi ATP pada berbagai sel.¹⁰ Meskipun demikian, hati merupakan salah satu jaringan yang memiliki kapasitas jalur glikolitik, yang juga menghasilkan ATP, lebih besar dari jaringan-jaringan tubuh lain, sehingga penurunan produksi ATP tidak sebesar yang terjadi pada jaringan lain karena adanya jalur ini.¹⁰

Meskipun demikian, hati juga merupakan salah satu jaringan yang paling rentan terhadap hipoksia. Hipoksia pada hati biasanya dimulai dari area sentrilobuler, dengan area periportal tetap normoksik. Hal ini disebabkan area sentrilobuler terletak paling jauh dari traktus portalis, saluran tempat berjalannya a. hepatica dan v. porta hepatica. Penurunan produksi ATP sel menyebabkan penurunan fungsi $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ yang menyebabkan akumulasi Na^+ intraseluler, sehingga terbentuk tekanan osmotik di intrasel meningkat, yang mendorong perpindahan pasif air mengikuti gradien konsentrasi, menyebabkan terjadinya pembengkakan sel.^{35,36} Terbentuk blebs yang berasal dari transformasi mikrovilli pada sel-sel parenkim yang anoksik. Bleb dapat menghilang bila keadaan kembali menjadi normoksia. Menghilangnya bleb ini dapat disebabkan oleh pelepasan bleb dari sel, yang berakibat pada pelepasan enzim-enzim intrasel.^{32,36} Pada sel-sel hati yang hipoksik juga dapat dijumpai pengerutan (*shrinking*) dari sel-sel parenkim, pelebaran sinusoid, dan dilatasi fenestrasi sinusoid.^{10,36} Pembengkakan dan pengerutan sel yang berat dapat menyebabkan nekrosis sel.^{10,36}

Kadar sitokrom P-450 yang berperan luas dalam metabolisme berbagai ditemukan tetap hingga menurun pada hipoksia kronik.²⁰

Kadar enzim-enzim yang termasuk dalam sistem pertahanan terhadap radikal bebas didapatkan menurun pada hipoksia.^{20-23,48} Glutation reduktase dan glutation peroksidase menurun pada hipoksia akut dan kronik.²²

Pada sebuah penelitian, pada sel-sel hati didapatkan kadar malondialdehid (MDA) sebagai penanda stress oksidatif meningkat pada hari ke-21, konsentrasi SOD menurun signifikan pada hari ke-21, aktivitas glutation reduktase menurun signifikan pada hari ke-21, dan aktivitas katalase menurun pada hipoksia hari ke-1, namun kemudian kembali ke level semula pada hari-hari selanjutnya, sehingga hati mungkin lebih rentan mengalami stress oksidatif akibat hipoksia dibanding jaringan lain.^{18,22}

Hati juga salah satu jaringan yang dapat beradaptasi terhadap hipoksia kronik. Pada sebuah penelitian pada hewan percobaan dengan perlakuan hipoksia hipobarik selama 9 bulan didapatkan peningkatan massa mitokondria di hati. Peningkatan mitokondria mengkompensasi hipoksia melalui peningkatan difusi O_2 intraseluler yang lebih homogen.²³

2.3 Hipoksia pada Ketinggian

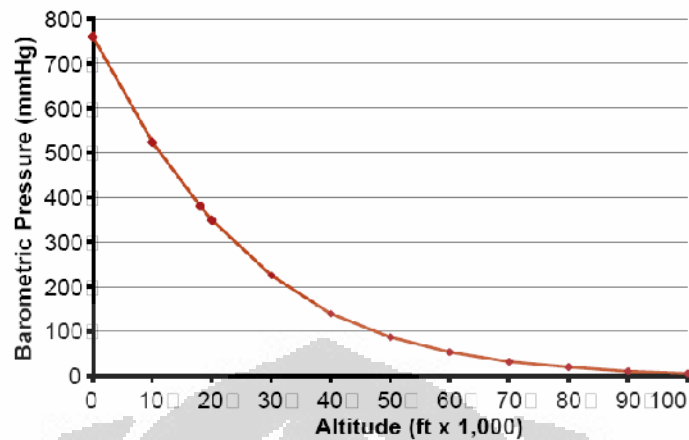
Tekanan atmosfer dan tekanan parsial oksigen menurun pada area yang terletak tinggi di atas permukaan laut.¹⁻⁹ Meskipun komposisi atmosfer tetap konstan pada berbagai ketinggian (78% nitrogen, 21% oksigen), tidak demikian dengan jumlah oksigen yang dapat dihirup secara fisiologis. Menurut Hukum Dalton, pada campuran gas, tekanan total pada campuran sebanding dengan sumasi tekanan masing-masing gas dalam komposisi tersebut.^{2,7} Pada ketinggian setinggi permukaan laut, tekanan atmosfer total sebesar 760 mmHg dan tekanan parsial oksigen (PO₂) adalah 159 mmHg. Tekanan oksigen sebesar ini adekuat untuk menghasilkan saturasi hemoglobin 98%.¹⁻³

Pada ketinggian 10,000 kaki, tekanan atmosfer total adalah sekitar 523 mmHg, dengan tekanan parsial oksigen 110 mmHg. Tekanan ini menghasilkan tekanan oksigen di alveoli (PAO₂) sebesar 60 mmHg, dan saturasi hemoglobin 87%, yang menyebabkan gejala hipoksia insidiosa.² Menurut sumber lain, manifestasi penyakit pada ketinggian (*high altitude illness*) mulai muncul pada ketinggian lebih dari 1,500 m (4,921 kaki) di atas permukaan laut.¹

| Altitude | | Pressure (mm Hg) | Temperature (°C) | Altitude | | Pressure (mm Hg) | Temperature (°C) |
|----------|-------|---------------------|---------------------|----------|--------|---------------------|---------------------|
| (ft) | (m) | | | (ft) | (m) | | |
| 0 | 0 | 760 | +15.0 | 25,000 | 7,620 | 282 | -34.5 |
| 1,000 | 305 | 733 | +13.0 | 30,000 | 9,144 | 226 | -44.4 |
| 2,000 | 610 | 706 | +11.0 | 35,000 | 10,668 | 179 | -54.2 |
| 3,000 | 914 | 681 | +9.1 | 40,000 | 12,192 | 141 | -56.5 |
| 4,000 | 1,219 | 656 | +7.1 | 45,000 | 13,716 | 111 | -56.5 |
| 5,000 | 1,525 | 632 | +5.1 | 50,000 | 15,240 | 87.3 | -56.5 |
| 6,000 | 1,829 | 609 | +3.1 | 55,000 | 16,764 | 68.8 | -56.5 |
| 7,000 | 2,134 | 586 | +1.1 | 60,000 | 18,288 | 54.1 | -56.5 |
| 8,000 | 2,438 | 565 | -0.9 | 65,000 | 19,812 | 42.3 | -56.5 |
| 9,000 | 2,743 | 543 | -2.8 | 70,000 | 21,336 | 33.3 | -55.2 |
| 10,000 | 3,048 | 523 | -4.8 | 80,000 | 24,384 | 20.7 | -52.1 |
| 15,000 | 4,572 | 429 | -14.7 | 90,000 | 27,432 | 13.0 | -49.1 |
| 20,000 | 6,096 | 349 | -24.6 | 100,000 | 30,480 | 8.2 | -46.0 |

Gambar 2.5. Tabel Tekanan Barometrik dan Temperatur pada Berbagai Ketinggian menurut International Civil Aviation Organization

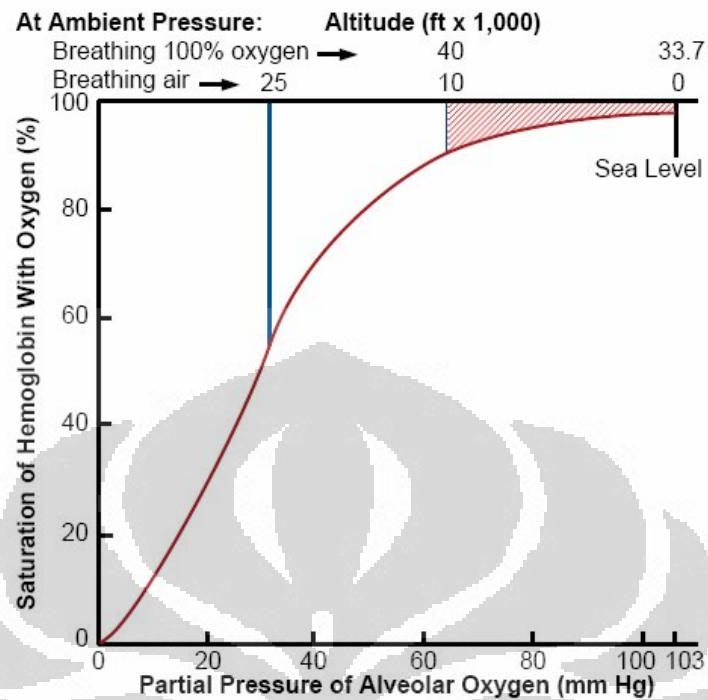
Pandoff KB, Burr RE, editors. Medical aspects of harsh environments. 3rd ed. USA: Office of The Surgeon General, Dept. Of The Army; 2002.



Gambar 2.6. Hubungan Eksponensial Tekanan Barometrik terhadap Ketinggian

Sumber: Pandoff KB, Burr RE, editors. Medical aspects of harsh environments. 3rd ed. USA: Office of The Surgeon General, Dept. Of The Army; 2002.

Hubungan antara saturasi hemoglobin, tekanan parsial oksigen berbentuk kurva sigmoid, yang meminimalisasi efek fisiologis dari penurunan tekanan parsial oksigen,² yang menyebabkan proteksi pada individual hingga ketinggian 10,000 kaki. Di atas 10,000 kaki, persentase saturasi hemoglobin mulai mengalami penurunan.



Gambar 2.7. Grafik Hubungan antara Ketinggian, PAO₂, dan Saturasi Hemoglobin

Pandoff KB, Burr RE, editors. Medical aspects of harsh environments. 3rd ed. USA: Office of The Surgeon General, Dept. Of The Army; 2002.

Hipoksia bukanlah satu-satunya faktor yang berperan mengganggu homeostasis tubuh. Pada ketinggian, tekanan oksigen yang rendah, temperatur yang menurun dan radiasi ultraviolet yang meningkat juga berkontribusi mendorong terjadinya stress pada tubuh.^{1,18} Gejala penyakit akibat ketinggian lebih berat pada kombinasi normoksia dan hipobaria dibanding pada hipoksia dan normobaria. Temperatur menurun $\pm 6.5^{\circ}\text{C}$ setiap ketinggian meningkat 1,000 m (3,280 kaki), yang meningkatkan kebutuhan oksigen untuk mempertahankan suhu tubuh. Penetrasi sinar ultraviolet meningkat 4% setiap ketinggian meningkat 300 m (985 kaki).¹

2.3.1 Mekanisme Adaptasi pada Ketinggian

Saat seorang individu terpajan pada ketinggian, kemoreseptor pada badan karotis mendeteksi penurunan tekanan oksigen pada darah arteri (PaO_2) dan menstimulasi respon ventilasi hipoksik, yang menyebabkan hiperventilasi. Hiperventilasi meningkatkan hilangnya air melalui proses respirasi, peningkatan PaO_2 , dan penurunan tekanan parsial karbon monoksida arteri (PaCO_2). Fluktuasi PaO_2 dan PaCO_2 menginduksi pola pernapasan periodik (pernapasan Cheyne-Stokes). Terjadi alkalosis respiratorik akibat meningkatnya pengeluaran karbon dioksida melalui ekspirasi yang semakin dalam dan cepat, namun alkalosis respiratorik ini dikompensasi dalam 24-48 jam melalui ekskresi bikarbonat melalui ginjal.¹

Rendahnya PaO_2 karena penurunan tekanan parsial oksigen dan rendahnya volume darah akibat dehidrasi menyebabkan peningkatan kadar katekolamin dalam darah. Katekolamin memicu peningkatan frekuensi denyut jantung, tekanan darah, dan tonus vena.¹

Hipoksia juga memicu kontraktibilitas pembuluh darah paru-paru, meningkatkan tekanan arteri paru-paru dan aliran darah ke otak. Hipokapnea menyeimbangkan hal ini dengan menyebabkan penurunan aliran darah ke otak.¹

Untuk meningkatkan kemampuan darah mendistribusikan oksigen, hipoksia memicu peningkatan produksi eritropoietin oleh ginjal. kadar eritropoietin meningkat dalam 2 jam dan eritrosit baru terbentuk dalam waktu 4 hari. Peningkatan produksi 2,3 bifosfoglisarat (2,3-BPG) mengubah kurva disosiasi oksihemoglobin ke kanan, mempermudah disosiasi molekul O_2 dari hemoglobin dan melawan efek pergeseran kurva disosiasi ke kiri akibat alkalosis dan hipokarbia. Seluruh mekanisme tersebut berperan dalam mempertahankan distribusi O_2 yang adekuat ke jaringan.¹

Respon individu terhadap hipoksia pada ketinggian dapat berbeda-beda, dan terdapat berbagai variabel yang menentukan cepatnya awitan dan beratnya gejala, di antaranya:

- ketinggian yang dicapai (yang menentukan PAO_2),^{2,19}
- *rate of ascent* ke ketinggian,^{2,19}

- durasi waktu di ketinggian (secara umum, paparan yang lebih lama menyebabkan peningkatan efek),^{2,19}
- suhu (peningkatan laju metabolisme dapat menyebabkan hipoksia pada ketinggian rendah),^{2,19}
- aktivitas fisik (peningkatan kebutuhan oksigen dapat menyebabkan awitan hipoksia klinis yang semakin cepat),^{2,19}
- faktor individual (toleransi individu terhadap hipoksia, *physical fitness*, keadaan emosi, aklimatisasi, dan perilaku merokok),^{2,19}

2.3.2 Manifestasi Gangguan Fungsi Organ pada Ketinggian

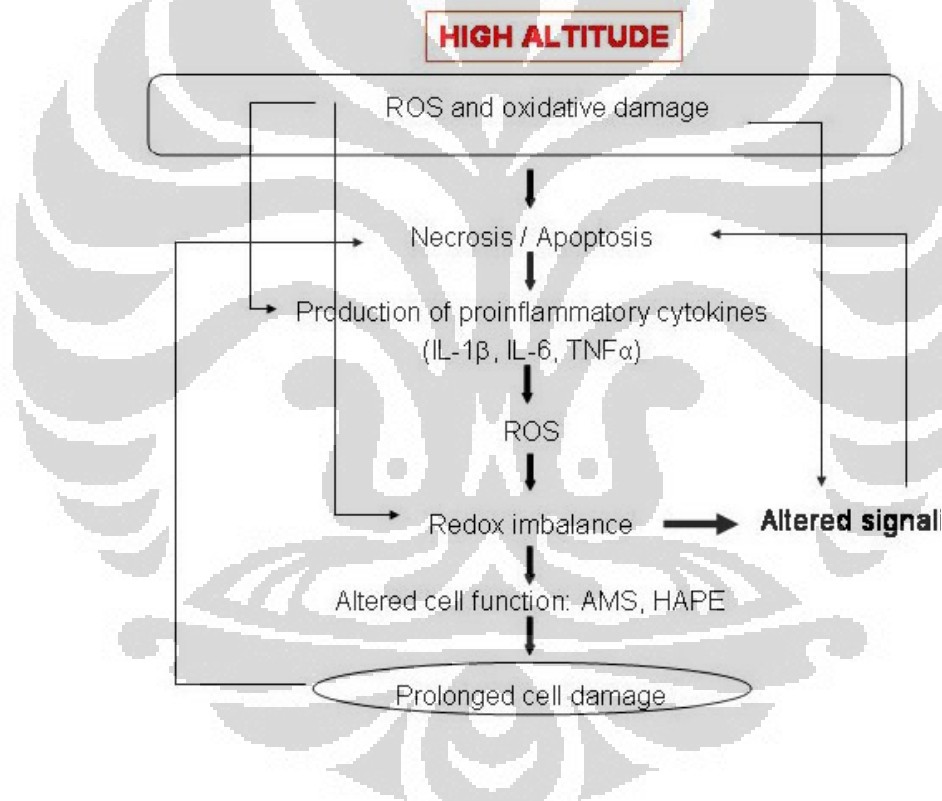
Kondisi hipoksia yang belum terkompensasi oleh proses adaptasi tubuh bermanifestasi sebagai gangguan fungsi pada berbagai organ, di antaranya penurunan fungsi indera seperti penurunan indera penglihatan (penurunan kemampuan adaptasi terhadap gelap, visus, dan lapangan pandang), indera pendengar, dan indera peraba, gangguan fungsi saraf pusat seperti perubahan proses mental seperti gangguan fungsi kognitif, delirium, koordinasi psikomotor, hingga penurunan kesadaran, kejang, dan henti napas (apnea) pada tahap yang berat.¹

2.3.3 Ketinggian dan Stress Oksidatif

Pajanan ketinggian (*high altitude*) sering berakibat pada kerusakan oksidatif pada makromolekul. Tekanan oksigen yang rendah mempermudah pembentukan spesies oksigen reaktif. Kerusakan oksidatif dapat merupakan konsekuensi dari peningkatan aktivitas sistem pembentukan spesies oksigen reaktif dan penurunan aktivitas sistem antioksidan.¹⁸

Pajanan terhadap ketinggian, terutama dalam jangka waktu pendek, atau bersifat akut, baik tunggal maupun berulang, menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid di berbagai jaringan. Pajanan akut berulang terhadap ketinggian menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid pada serat otot tikus. Pajanan dalam jangka waktu pendek (5 hari) terhadap ketinggian 7576 m menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid pada plasma tikus.¹⁸

Pajanan terhadap ketinggian juga menyebabkan peningkatan malondialhdehid (MDA) serum, paru-paru, hati, jantung, dan ginjal. Penelitian pada manusia menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda. Pajanan akut terhadap ketinggian meningkatkan kerusakan rantai DNA, yang diukur dari urin. Jika manusia terpajan dengan ketinggian (2700 m) dan suhu dingin, peroksidasi lipid dan kerusakan DNA meningkat secara signifikan. Pada studi Operation Everest III tingkat peroksidasi meningkat 23% pada ketinggian pada ketinggian 6000 m, dan 79% pada ketinggian 8848 m, mengindikasikan bahwa tingkat stress oksidatif parallel dengan meningkatnya ketinggian.^{8,18}



Gambar 2.8. Mekanisme Inflamasi yang Diinduksi oleh Ketinggian.

Sumber: Bakonyi T, Radak Z. High altitude & free radicals. *Journal of Sports Science and Medicine* 2004;(3).

2.3.3.1 Sistem Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif pada Ketinggian

Suplai oksigen yang masif (hiperoksia) telah terbukti meningkatkan pembentukan radikal bebas. Namun, hipoksia menyebabkan stress reduksi, yang

juga berujung pada meningkatnya produksi spesies oksigen reaktif oleh sistem transport elektron di mitokondria.^{18,42} ROS dibentuk pada kompleks I dan kompleks III di rantai transport elektron mitokondria. Pada hipoksia, berkurangnya molekul O₂ untuk direduksi menjadi H₂O di sitokrom oksidase menyebabkan akumulasi equivalen pereduksi di dalam rantai respirasi mitokondria. Hal ini disebut sebagai stress reduktif, yang menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif melalui auto-oksidasi salah satu atau lebih kompleks mitokondria seperti pasangan redoks (*redox couple*) ubikuiin-ubikuiinon. Peningkatan rasio NADH/NAD⁺ seluler saat hipoksia terkait dengan stress reduktif.^{18,43}

Sistem xantin dehidrogenase/oksidase merupakan generator spesies oksigen reaktif yang poten pada kondisi hipoksia/reperfusi. Efek terhadap sistem xantin dehidrogenase/oksidase pada pajanan intermiten terhadap ketinggian menimbulkan efek menyerupai yang terjadi pada kondisi iskemia/reperfusi.¹⁸

Akan tetapi, perubahan pola spesies oksigen reaktif dan nitrit oksida berbeda pada kondisi iskemia/reperfusi dan pada pajanan terhadap ketinggian. Pada iskemia/reperfusi, respon awal yang terjadi disertai oleh peningkatan pembentukan spesies oksigen reaktif dan dihambat oleh antioksidan serta intervensi yang meningkatkan secara reversible kadar nitrit oksida jaringan. Berkebalikan dengan yang terjadi pada iskemia/reperfusi, kadar spesies oksigen reaktif meningkat selama hipoksia dan kembali ke kadar selama periode pre-hipoksia setelah kembali ke keadaan normoksia. Aklimatisasi menyebabkan peningkatan (*up-regulation*) *inducible* NO sintase (iNOS), mengindikasikan bahwa hipoksia menyebabkan perubahan keseimbangan ROS/NO. Keseimbangan akan dicapai kembali setelah terjadi aklimatisasi.¹⁸

Radiasi UV yang meningkat pada ketinggian, juga berperan dalam meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif.¹⁸

Peningkatan pembentukan spesies oksigen reaktif pada pajanan terhadap ketinggian disebabkan oleh berbagai sumber, termasuk rantai respirasi mitokondria, xantin oksidase, dan iNOS.¹⁸

2.2.3.2 Efek Ketinggian pada Sistem Antioksidan

Kapasitas sistem antioksidan enzimatik menurun pada ketinggian. Paparan intermiten terhadap ketinggian menyebabkan penurunan aktivitas SOD pada otot rangka, hati, dan paru-paru hewan.¹⁸ Aktivitas glutathion peroksidase menurun pada hati.²² Pada sebuah penelitian yang membandingkan aktivitas glutathion peroksidase pada serum individu yang tinggal di ketinggian 4,000 m dengan individu yang tinggal pada ketinggian 0 m (setinggi permukaan laut). Didapatkan bahwa individu yang tinggal pada ketinggian 4,000 m memiliki tingkat aktivitas glutathion peroksidase lebih rendah. Paparan terhadap ketinggian menurunkan kadar glutathion tereduksi (GSH) dan meningkatkan kadar glutathion teroksidasi (GSSD).¹⁸

Namun, pada sebuah penelitian dengan perlakuan paparan yang sangat singkat terhadap ketinggian 8,000 tikus didapatkan peningkatan kadar melatonin darah. Melatonin merupakan hormon yang juga dapat berperan sebagai antioksidan. Dalam waktu 4 hari setelah perlakuan, didapatkan jumlah dan droplet lipid mitokondria dalam pinealosit, sel penghasil melatonin, menurun dibandingkan pada tikus kontrol, mengindikasikan adanya sumber lain penghasil melatonin.¹⁸

2.3.4 Efek Hipoksia dan Hipobaria pada Ketinggian pada Hati

Hipoksia menyebabkan penurunan fosforilasi oksidatif yang mengakibatkan penurunan produksi ATP. Meskipun demikian, hati merupakan salah satu jaringan yang memiliki kapasitas jalur glikolitik, yang juga menghasilkan ATP, lebih besar dari jaringan-jaringan tubuh lain, sehingga penurunan produksi ATP tidak sebesar yang terjadi pada jaringan lain karena adanya jalur ini.¹⁰

Meskipun demikian, hati juga merupakan salah satu jaringan yang paling rentan terhadap hipoksia. Hipoksia pada hati biasanya dimulai dari area sentrilobuler, dengan area periportal tetap normoksik.³⁵ Penurunan produksi ATP sel menyebabkan penurunan fungsi $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ yang menyebabkan akumulasi Na^+ intraseluler, sehingga terbentuk tekanan osmotik di intrasel meningkat, yang mendorong perpindahan pasif air mengikuti gradien konsentrasi, menyebabkan

terjadinya pembengkakan sel. Terbentuk blebs yang berasal dari transformasi mikrovilli pada sel-sel parenkim yang anoksik.^{32,36} Bleb dapat menghilang bila keadaan kembali menjadi normoksia. Menghilangnya bleb ini dapat disebabkan oleh pelepasan bleb dari sel, yang berakibat pada pelepasan enzim-enzim intrasel.³⁶ Pada sel-sel hati yang hipoksik juga dapat dijumpai pengerutan (*shrinking*) dari sel-sel parenkim, pelebaran sinusoid, dan dilatasi fenestrasi sinusoid.^{32,36} Pembengkakan dan pengerutan sel yang berat dapat menyebabkan nekrosis sel.³⁸

Kadar sitokrom P-450 yang berperan luas dalam metabolisme berbagai ditemukan tetap hingga menurun pada hipoksia kronik.²⁰

Kadar enzim-enzim yang termasuk dalam sistem pertahanan terhadap radikal bebas didapatkan menurun pada hipoksia. Glutation reduktase dan glutathion peroksidase menurun pada hipoksia akut dan kronik.^{21,22}

Pada sebuah penelitian, pada sel-sel hati didapatkan kadar malondialdehid (MDA) sebagai penanda stress oksidatif meningkat pada hari ke-21, konsentrasi SOD menurun signifikan pada hari ke-21, aktivitas glutathion reduktase menurun signifikan pada hari ke-21, dan aktivitas katalase menurun pada hipoksia hari ke-1, namun kemudian kembali ke level semula pada hari-hari selanjutnya, sehingga hati mungkin lebih rentan mengalami stress oksidatif akibat hipoksia dibanding jaringan lain.²¹

Hati juga salah satu jaringan yang dapat beradaptasi terhadap hipoksia kronik. Pada sebuah penelitian pada hewan percobaan dengan perlakuan hipoksia hipobarik selama 9 bulan didapatkan peningkatan massa mitokondria di hati. Peningkatan mitokondria mengkompensasi hipoksia melalui peningkatan difusi O₂ intraseluler yang lebih homogen.²³

2.4 Radikal Bebas

2.4.1 Definisi

Radikal bebas ialah atom, molekul, atau komponen yang sangat tak stabil karena struktur atomik atau molekularnya.²⁴⁻²⁹ Konfigurasi yang tak stabil ini diakibatkan adanya satu atau lebih elektron bebas yang tak berpasangan.

Radikal bebas merupakan modulator alami dan fisiologis keseimbangan redoks seluler dan karenanya berperan dalam penyampaian sinyal dan pengontrolan berbagai proses fisiologis maupun patofisiologis.¹⁸

Radikal bebas dapat bermuatan positif, negatif, atau netral. Radikal bebas terbentuk sebagai senyawa intermediet di berbagai reaksi biokimia, namun jika terbentuk dalam jumlah yang berlebih, dapat mengganggu kestabilan berbagai makromolekul. Karakteristik yang menonjol dari senyawa radikal ialah reaktivitas kimianya yang tinggi, yang tidak hanya menimbulkan aktivitas biologik normal senyawa-senyawa tersebut, namun juga mampu menimbulkan kerusakan pada sel.

2.4.2 Reaksi

Agar menjadi molekul stabil, radikal bebas dapat mengalami berbagai reaksi, yaitu:²⁷

1. Abstraksi hidrogen. Radikal berinteraksi dengan molekul lain yang memiliki atom hidrogen bebas (donor hidrogen). Akibatnya, radikal bebas menjadi stabil sedangkan donor hidrogen berubah menjadi radikal bebas.
2. Adisi (penambahan). Radikal berikatan dengan molekul stabil, menghasilkan molekul kombinasi dengan struktur tak stabil.
3. Terminasi. Dua buah molekul radikal bebas saling bereaksi menghasilkan molekul stabil.
4. Disproporsionasi. Dua buah molekul radikal yang identik bereaksi satu dengan lainnya, di mana salah satu radikal menjadi donor elektron bagi radikal lainnya, menghasilkan dua buah molekul yang stabil.

2.4.3 Spesies Oksigen Reaktif

Dua puluh satu persen gas yang menyusun atmosfer adalah oksigen. Oksigen merupakan substansi yang esensial dibutuhkan untuk kehidupan karena perannya yang begitu besar dalam metabolisme sel untuk menghasilkan energi bagi kehidupan sel. Di dalam sel, 90% oksigen digunakan dalam rantai transport elektron di mitokondria oleh sitokrom oksidase.^{18,24}

Di samping kegunaannya dalam menjamin berlangsungnya metabolisme sel yang adekuat, oksigen juga memiliki potensi toksik. Struktur elektronik oksigen

merupakan penyebab paradoks ini karena selain mendorong terjadinya reduksi oksigen yang bertahap yang berguna untuk membentuk ATP dalam rantai transpor elektron, juga menyebabkan terbentuknya radikal oksigen dan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS) yang mampu menyebabkan cedera sel.^{24,26}

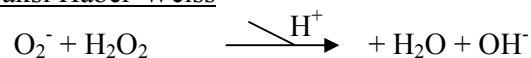
Di dalam atom dan molekul, oksigen menempati regio yang dikenal sebagai orbit dengan setiap orbit mampu mengandung 2 molekul elektron, yang satu berputar searah jarum jam, dan elektron lain berputar berlawanan arah jarum jam. Saat orbit hanya mengandung 1 elektron (tidak berpasangan), molekul atau atom yang mengandung 1 elektron tak berpasangan disebut sebagai radikal bebas. Oksigen dikualifikasikan sebagai radikal bebas karena mengandung 2 molekul oksigen yang tidak berpasangan, masing-masing terletak pada orbit yang berbeda dan berputar ke arah yang sama (spin paralel).

2.4.3.1 Jenis

1. Anion superoksida (O_2^-)

Merupakan molekul oksigen yang mengandung 1 elektron tak berpasangan, molekul ini dapat terbentuk dari O_2 bebas dengan pemberian 1 elektron ke radikal bebas lain. Superoksida terutama dibentuk di rantai transpor elektron mitokondria yang membocorkan radikal bebas ke koenzim Q (KoQ), membentuk molekul $KoQH^+$, meskipun radikal bebas tersebut terikat kuat ke enzim lain. Interaksi nonspesifik antara $KoQH^+$ dan O_2 menyebabkan terbentuknya superoksida.²⁴ Spesies ini sangat reaktif namun memiliki kelarutan lemak yang terbatas sehingga tidak dapat berdifusi jauh.^{24,30} Juga dapat menghasilkan radikal hidroksil dan hidoperoksi yang lebih reaktif melalui reaksi dengan H_2O_2 dalam reaksi Haber-Weiss.²⁴

Reaksi Haber-Weiss



2. Radikal hidroksil (OH^-)

Radikal hidroksil mungkin merupakan spesies oksigen reaktif yang paling poten, dan mungkin menjadi inisiator reaksi berantai yang membentuk peroksida lemak dan radikal organik.²⁴

3. Hidrogen peroksida (H₂O₂)

Hidrogen peroksida sebenarnya bukan suatu radikal. Molekul ini merupakan zat pengoksidasi, dan dengan adanya Fe²⁺ atau logam transisi lain, menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton.²⁴

Reaksi Fenton:



Hidrogen peroksida bersifat larut lemak, dan karenanya dapat berdifusi dalam lemak dan menimbulkan kerusakan di membran lokal yang mengandung Fe²⁺ yang terletak jauh dari tempat pembentukan molekul itu sendiri.^{24,30}

Pada granulosit sistem imun, H₂O₂ menghasilkan asam hipoklorit (HOCl) selama proses ledakan pernapasan.²⁴

2.4.3.2 Pembentukan

Radikal yang berasal dari oksigen dibangkitkan secara konstan sebagai bagian dari reaksi reduksi-oksidasi selama proses metabolisme aerob, baik fisiologis maupun patologis.^{10,18,24,27,30} Proses-proses yang secara alamiah menghasilkan molekul spesies oksigen reaktif di antaranya:

1. Rantai respirasi mitokondria

Radikal oksigen terbentuk di mitokondria saat terjadi reduksi oksigen pada rantai transport elektron.

2. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim yang menggunakan O₂

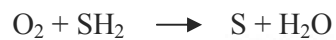
Enzim yang mengkatalisis reaksi yang melibatkan oksigen dapat diklasifikasikan sebagai oksidase atau oksigenase.

a. Oksidase

Sitokrom c oksidase memindahkan elektron ke dalam O₂, yang tereduksi menjadi H₂O atau H₂O₂. Enzim ini mengkatalisis reduksi 4 elektron O₂ menjadi H₂O. Sebagian besar oksidase di dalam sel

membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) dan bukan H_2O .²⁴ Enzim ini biasanya ditemukan di dalam peroksisom atau mitokondria tempat H_2O_2 dibersihkan oleh 2 enzim pertahanan sel, katalase dan glutathion peroksidase.^{24,26,27,30}

Oksidase



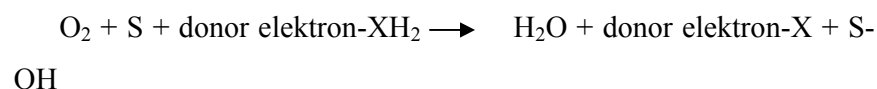
b. Oksigenase

Oksigenase memasukkan molekul oksigen ke dalam substrat enzim tersebut. Oksigenase terdiri atas monooksigenase dan dioksigenase.

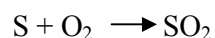
Monooksigenase memasukkan 1 atom oksigen ke dalam substrat dan 1 atom oksigen lain ke dalam H_2O . Monooksigenase juga dikenal sebagai hidrosilase. Monooksigenase memerlukan sebuah substrat donor elektron misalnya NADPH, suatu koenzim misalnya FAD yang dapat memindahkan elektron tunggal, dan logam atau senyawa serupa untuk membentuk kompleks oksigen reaktif.²⁴ Sitokrom P450 merupakan salah satu dari superfamili monooksigenase yang menghidrosilasi banyak senyawa fisiologis seperti steroid dan asam lemak, dan banyak senyawa xenobiotik seperti obat, karsinogen, dan bahan lingkungan.²⁴ Sitokrom P450 terdapat dalam jumlah ekstensif di hati.

Dioksigenase memasukkan 2 molekul oksigen ke dalam substrat, ditemukan di jalur yang mengubah arakhidonat menjadi prostagandin, tromboksan, dan leukotrien.²⁴

Monooksigenase



Dioksigenase



3. Ledakan pernapasan selama fagositosis oleh granulosit sistem imun

Selama fagositosis terjadi pembebasan spesies oksigen reaktif. Ledakan pernapasan (*respiratory burst*) yang terjadi di dalam sel granulomatosit, seperti makrofag, neutrofil, dan eosinofil, sebagai respon terhadap agen patologis atau rangsangan lain merupakan sumber utama anion superoksida (O_2^-), H_2O_2 , radikal hidroksil (OH^\cdot), radikal hipoklorit ($HOCl$), nitrogein monoksida (NO), dan radikal bebas lainnya. Proses pembentukan spesies oksigen reaktif ini dimaksudkan untuk merusak membran dan komponen sel lain dari agen patogen.^{10,24}

Di samping pembentukan yang terjadi secara kontinu di dalam tubuh, radikal bebas juga dapat berasal dari lingkungan eksogen. Beberapa keadaan patologis yang memicu produksi spesies oksigen reaktif secara berlebihan dalam sel di antaranya:

- Sel yang terpajan lingkungan abnormal seperti hipoksia atau hiperoksia membangkitkan radikal oksigen dalam jumlah besar.^{18,24}
- Beberapa obat, misalnya obat untuk kanker, memiliki efek oksidasi terhadap sel dan mengakibatkan produksi radikal oksigen dalam sel tersebut.^{24,27}
- *Ionizing radiation* dikenal mampu membangkitkan radikal oksigen dalam sistem biologis.^{10,24,27}

2.4.3.3 Efek Biologis

Spesies oksigen reaktif bersifat toksik karena ketidakstabilan konformasinya yang menjadikannya sangat reaktif terhadap berbagai komponen penyusun sel, seperti protein, lemak membran, karbohidrat, dan asam nukleat.^{10,24-27}

1. Efek pada karbohidrat

Radikal hidroksil bereaksi dengan karbohidrat dengan mengabstraksi atom hidrogen dari salah satu atom karbon, menghasilkan

radikal karbonil. Hal ini menyebabkan pemutusan rantai karbohidrat pada molekul seperti asam hyaluronat.²⁸

2. Efek pada protein

Oksidasi asam amino dapat menimbulkan perubahan konformasi hingga fragmentasi, pembentukan ikatan-silang dan agregasi protein, serta kerentanan terhadap digesti proteolitik oleh enzim-enzim seluler.^{24,26,27}

Asam amino yang terutama rentan terhadap kerusakan oksidatif, terutama akibat radikal hidroksil, adalah prolin, histidin, arginin, sistein, dan metionin.²⁴

3. Efek pada lemak membran

Peroksidasi molekul lemak selalu mengubah atau merusak struktur molekul lemak. Asam lemak utama yang mengalami peroksidasi lemak di dalam membran sel adalah asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA). Peroksidasi lipid diinisiasi dengan abstraksi atom hidrogen dari rantai samping PUFA, menyebabkan pembentukan radikal peroksil (ROO[•]). Selain merusak enzim reseptor protein intramembran, radikal peroksil juga dapat mengabstraksi atom H⁺ dari rantai asam lemak lain, sehingga proses peroksidasi lipid selanjutnya terinisiasi, membentuk semakin banyak peroksida lipid.^{24,26} Peroksidasi lipid dapat menjadi ekstensif setelah suatu kejadian inisial awal karena radikal yang dihasilkan dapat mereinisiasi peroksidasi lipid selanjutnya.²⁶

Lipid peroksida dalam membran mengganggu fungsi membran dengan mengubah fluiditas membran, menyebabkan ion-ion seperti Ca²⁺ masuk ke dalam sel dan mengganggu fungsi makromolekul lain.²⁶ Selain menyebabkan degradasi membran lemak, proses peroksidasi lipid juga menyebabkan terbentuknya berbagai produk seperti malondialdehid serta etana dan pentana. Malondialdehid menimbulkan ikatan-silang pada protein.²⁴

4. Efek pada asam nukleat

Radikal hidroksil dapat memicu pemutusan rantai DNA serta perubahan deoksiribosa serta basa purin dan pirimidin.^{10,24,26} Pada manusia, kerusakan oksidatif terhadap DNA diperkirakan mencapai sekitar 104 per sel per hari.²⁸ Jika mekanisme perbaikan DNA yang ada tidak mampu mengatasi mutasi yang terjadi, dapat terjadi kerusakan permanen DNA yang menyebabkan mutasi di tingkat fenotip.^{10,24,26,28}

ROS tidak selalu menimbulkan efek negatif. ROS dibangkitkan dalam tubuh dengan tujuan tertentu. Fagosit menghasilkan ROS untuk membunuh patogen. ROS juga terlibat dalam berbagai proses *signaling* intra dan interseluler. Sebagai contoh, penambahan superoksida atau hidrogen peroksida pada sel-sel yang dikultur terbukti meningkatkan laju replikasi DNA dan proliferasi sel, dengan kata lain, ROS berfungsi sebagai mitogen.²⁷

2.5 Antioksidan

Mekanisme pertahanan sel terhadap radikal bebas dikenal sebagai mekanisme antioksidan, yang mencakup:

1. Enzim antioksidan untuk mengeluarkan spesies oksigen reaktif, vitamin, dan *scavenger* (penyapu) radikal bebas antioksidan, kompartemensi sel, dan mekanisme perbaikan (*repair*). Enzim penyapu yang bersifat antioksidan mengeluarkan atau menyingkirkan superoksida dan hidrogen peroksida.^{10,24-30}
2. Vitamin E, vitamin C, dan mungkin karotenoid, yang disebut sebagai vitamin antioksidan, dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas.^{10,24-30}
3. Mekanisme pertahanan kompartemensi. Mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas dengan pemisahan spesies dan tempat yang terlibat dalam pembentukan spesies oksigen reaktif dari bagian sel lainnya. Sebagai contoh, besi, yang memacu pembentukan ion hidroksil secara nonenzimatik, berikatan erat dengan protein tempat besi tersebut tersimpan, yaitu ferritin, dan tidak dapat bereaksi dengan spesies oksigen reaktif. Juga enzim-enzim yang proses kerjanya menghasilkan H₂O₂ yang terdapat di dalam peroksisom dengan kandungan enzim antioksidan yang tinggi.²⁴

4. Mekanisme perbaikan (*repair*). Mencakup mekanisme perbaikan DNA, pengeluaran asam lemak yang teroksidasi dari lemak membran, dan perbaikan protein dan asam amino yang teroksidasi melalui degradasi dan sintesis protein.^{10,24}

2.5.1 Enzim-enzim Antioksidan

Pertahanan enzimatik terhadap spesies oksigen reaktif meliputi superoksida dismutase, glutathion peroksidase, dan katalase.^{10,24-30}

1. Superoksida dismutase (SOD)

Superoksida dismutase (nomor klasifikasi EC 1.15.1.1) mengkonversi 2 molekul superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen.^{10,24-30} Dismutasi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan O₂ oleh superoksida dismutase sering disebut sebagai pertahanan primer terhadap stress oksidatif karena superoksida merupakan inisiator kuat berbagai reaksi berantai. H₂O₂ yang dihasilkan bersifat kurang reaktif, dan karenanya kurang toksik dibandingkan superoksida. SOD mengakselerasi reaksi detoksifikasi ini sekitar 10,000 kali dibandingkan reaksi yang tidak dikatalisasi.²⁴

Dismutasi superoksida



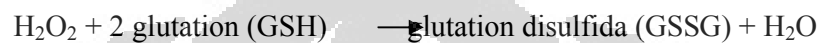
SOD merupakan enzim yang mengandung senyawa logam yang aktivitas antioksidannya bergantung pada mangan, tembaga (Cu²⁺), atau seng (*zinc*, Zn) yang terikat padanya.^{28,29} Enzim ini banyak terdapat di dalam sitosol dan mitokondria. Pada mamalia, enzim-mangan banyak terdapat di mitokondria, sedangkan enzim yang banyak terdapat di sitosol adalah enzim yang mengandung seng atau tembaga.²⁸

2. Glutathion reduktase dan glutathion peroksidase

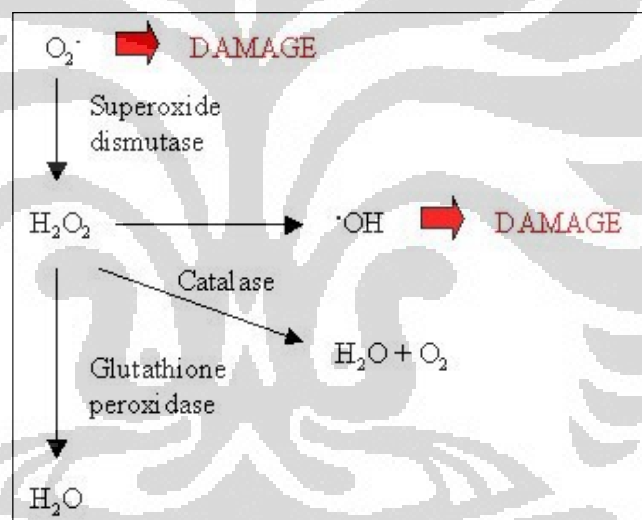
Sistem glutathion peroksidase terdiri dari beberapa komponen, termasuk glutathion peroksidase dan glutathion reduktase dan kofaktor glutathion (GSH) dan NADPH. Glutathion peroksidase (nomor klasifikasi EC 1.15.1.9) berperan dalam proses reduksi H₂O₂ dan peroksida lemak

oleh glutathion (GSH).^{10,24-30} Gugus sulhidril pada glutathion (GSH) berfungsi sebagai donor elektron, dan dioksidasi menjadi bentuk disulfida (GSSG). Bila gugus disulfida telah terbentuk, gugus tersebut harus direduksi kembali menjadi bentuk sulhidril oleh glutathion reduktase.^{24,26,27} Glutathion memerlukan NADPH sebagai kofaktor yang berperan mendonorkan elektron. Sel memiliki 2 glutathion peroksidase, salah satunya memerlukan selenium untuk aktivitasnya.^{24,26,27}

Reduksi hidrogen peroksida (oksidasi glutathion)



Reduksi glutathion



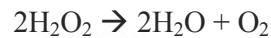
Gambar 2.9. Aktivitas Reduksi Senyawa Radikal Bebas oleh Enzim-enzim Antioksidan

3. Katalase

Selain glutathion peroksidase, enzim lain yang berperan dalam dekomposisi hidrogen peroksida ialah katalase.^{10,24-30}

2.6 Katalase

Katalase (nomor klasifikasi enzim EC 1.15.1.6) merupakan enzim yang mengkatalisis konversi hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi molekul air dan oksigen. Di samping memiliki aktivitas peroksidase, enzim ini mampu menggunakan 1 molekul H_2O_2 sebagai substrat atau donor elektron dan molekul H_2O_2 yang lain sebagai oksidan atau akseptor elektron.



Enzim ini diproduksi oleh organisme aerobik, mulai organisme uniseluler seperti bakteri hingga manusia.³⁰ Gen yang memproduksi katalase pada manusia telah diidentifikasi. Gen tersebut memiliki basa sepanjang 34 kb dan terpisah menjadi 13 ekson.⁴⁴

Katalase terutama terdapat dalam peroksisom, dan sedikit di dalam fraksi sitosol dan mikrosom sel.^{24-30,44} Pada sebuah penelitian, didapatkan bahwa pada hati tikus, katalase juga terdapat di dalam mitokondria.⁴⁵ Peroksisom kaya akan oksidase dan katalase, yang merupakan salah satu bentuk mekanisme pertahanan kompartemensi terhadap radikal bebas.^{24,25}

2.6.1 Struktur

Katalase merupakan protein dengan struktur tetramer berbentuk *dumbbell*. Tetramernya terdiri dari subunit-subunit yang identik dengan berat molekul (BM) 220,000 sampai 350,000 kDa.⁴⁶ Sebagian katalase terdapat dalam bentuk tetramer dengan berat molekul 60 atau 75 kDa. Setiap subunit (monomer) mengandung gugus heme (Fe^{3+}) di pusat katalitiknya. Gugus heme ini terhubung keluar melalui saluran hidrofobik. Ion Fe^{3+} yang terdapat di molekul katalase berperan dalam katalisis cepat pemecahan H_2O_2 . Pemandahan ion Fe^{3+} dari subunit protein katalase mengakibatkan molekul protein kehilangan aktivitas katalitiknya.³⁰

Selain itu, monomer katalase dari spesies tertentu tiap subunit biasanya juga mengandung 1 molekul NADPH yang membantu menstabilkan enzim. NADP mungkin berperan sebagai kofaktor, mencegah pembentukan komponen inaktif dan melindungi enzim dari oksidasi oleh substratnya, hidrogen peroksida.⁴⁶

Struktur katalase sangat rigid dan stabil, resisten terhadap *unfolding*, yang menyebabkan katalase bersifat stabil. Enzim ini lebih resisten terhadap pH,

denaturasi termal, dan proteolisis dibanding enzim-enzim lain. Stabilitas dan resistensi terhadap proteolisis yang dimiliki katalase merupakan keuntungan evolusioner, terutama karena enzim ini diproduksi selama fase stasioner pertumbuhan sel di mana kadar protease tinggi dan laju *turnover* protein tinggi.⁴⁶

2.6.2 Mekanisme Kerja

Katalase mampu mengkatalisis reaksi penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui 2 mekanisme kerja yaitu katalitik dan peroksidatik.²⁷

a. Mekanisme katalitik

Terjadi bila enzim ini menggunakan molekul H_2O_2 sebagai substrat atau donor elektron dan molekul H_2O_2 yang lain sebagai oksidan atau akseptor elektron. Proses katalitik diduga terjadi dalam 2 tahap di mana H_2O_2 mengoksidasi kemudian mereduksi besi heme pada tempat aktif enzim.⁴⁶

Tahap I: molekul H_2O_2 mengoksidasi heme menjadi spesies oksiferri



Tahap II: molekul H_2O_2 kedua digunakan sebagai reduktan untuk meregenerasi enzim, menghasilkan H_2O dan O_2 .

b. Mekanisme peroksidatik

Terjadi bila menggunakan 1 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. Mekanisme ini dapat digambarkan sebagai berikut:

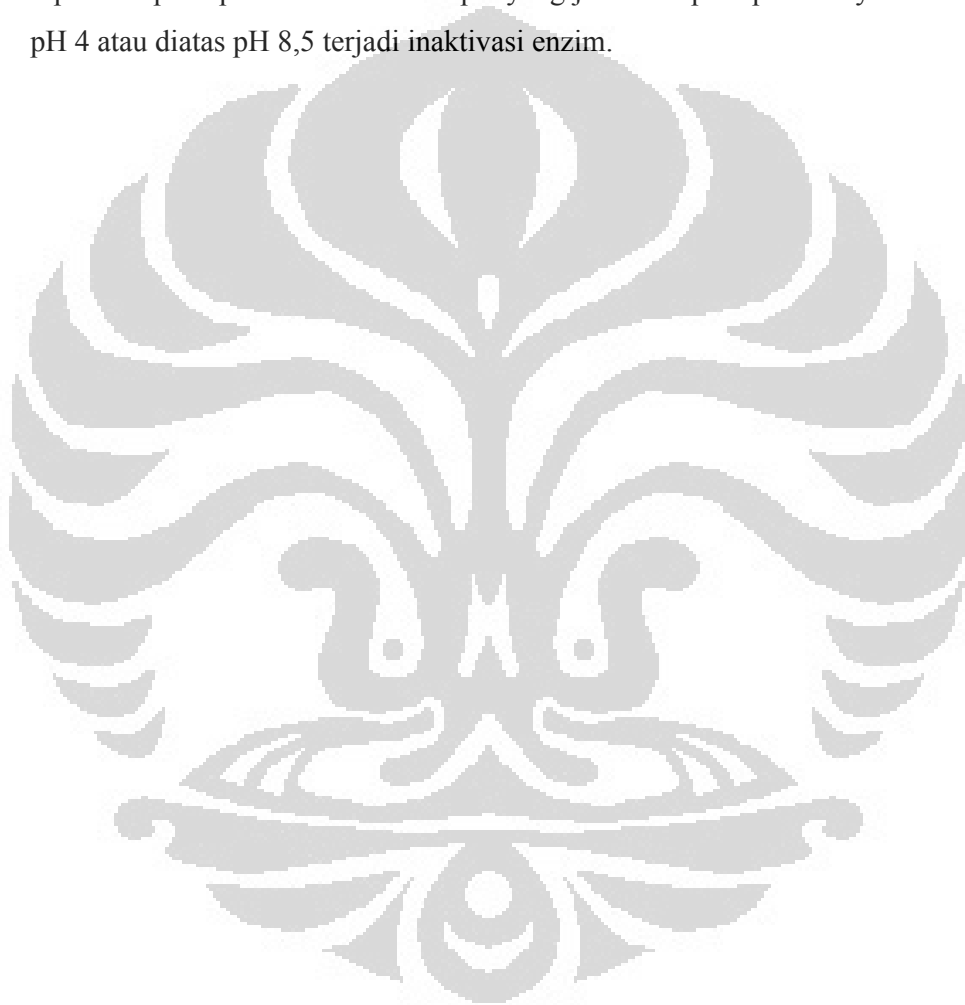


Senyawa donor elektron yang berupa metanol dan etanol akan dioksidasi menjadi aldehid yang sesuai yaitu formaldehid dan asetaldehid sedangkan asam formiat dioksidasi menjadi karbon dioksida dan ion nitrit dioksidasi menjadi nitrat.

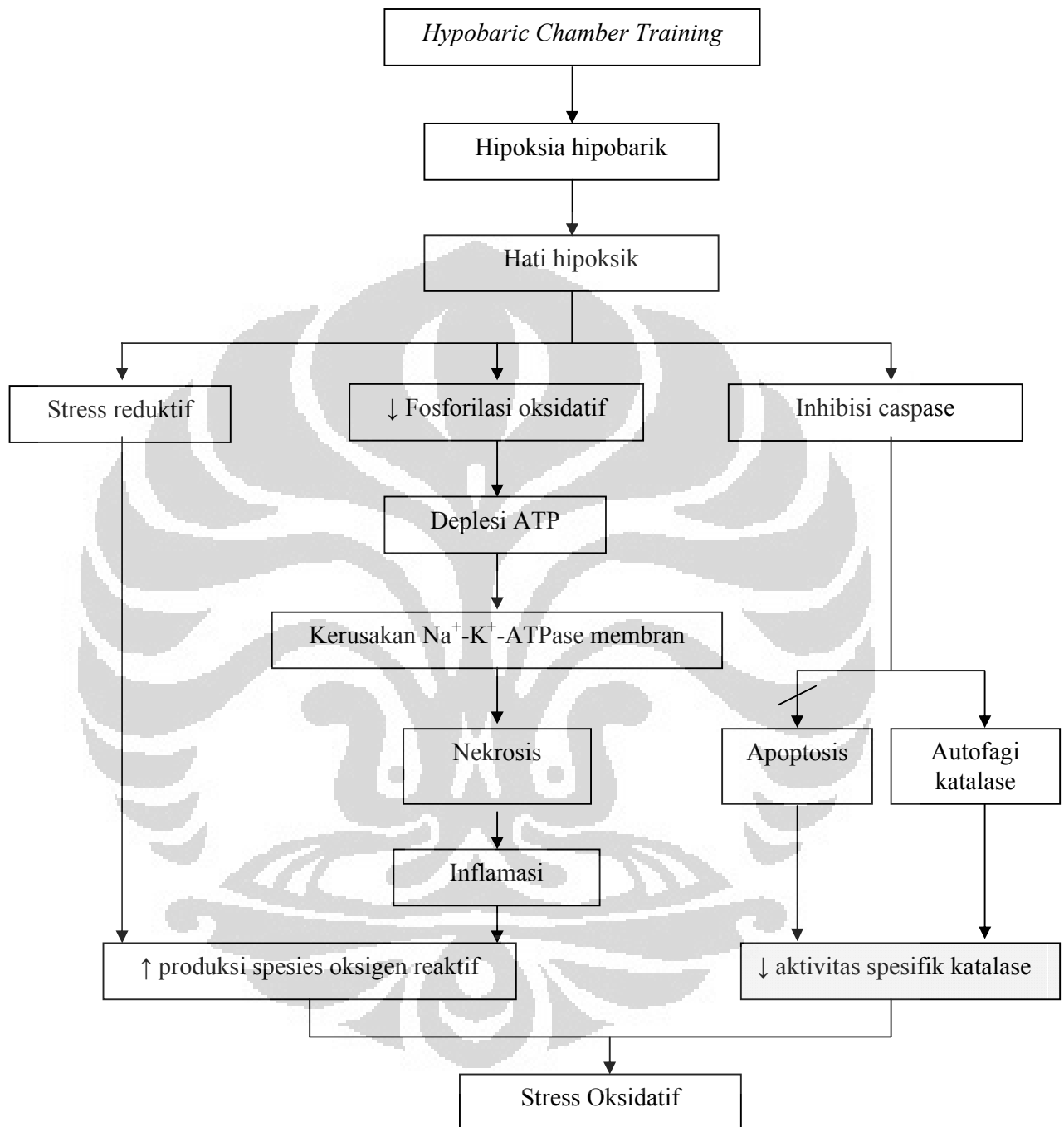
Aktivitas katalase dapat dihambat oleh azida, sianida, dan asam hipoklorit (HOCL). Zat-zat ini selain dapat menghambat aktivitas katalase juga menghambat aktivitas banyak enzim lain. Inhibitor yang kuat untuk enzim katalase adalah

aminotriazol. Aminotriazol menghambat aktivitas enzim katalase dengan cara mengikat senyawa 1 yang merupakan senyawa antara katalase-hidrogen peroksida.

Aktivitas katalase terutama ditemukan pada peroksisom sedangkan pada mitokondria, kloroplas dan retikulum endoplasma aktivitas katalase rendah. Enzim katalase dapat bekerja pada pH 4-8,5 namun aktivitas maksimum katalase diperoleh pada pH 7. Pada kisaran pH yang jauh dari pH optimum yaitu dibawah pH 4 atau diatas pH 8,5 terjadi inaktivasi enzim.



2.7 Kerangka Konseptual



Gambar 2.10. Kerangka konseptual

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini menguji aktivitas spesifik katalase jaringan hati tikus dengan menggunakan menggunakan metode spektrofotometri untuk mengukur penguraian H₂O₂.

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental deskriptif analitik untuk mengetahui aktivitas spesifik katalase dari sampel jaringan hati hewan percobaan secara spektrofotometri. Penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap:

- a. Pembuatan homogenat sampel
- b. Penentuan absorbansi optimal
- c. Pengukuran sampel
- d. Analisis data
- e. Pelaporan data

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan pelaksanaan prosedur perlakuan *hypobaric chamber* dilakukan di Lakespra Saryanto. Penelitian berlangsung selama satu tahun (Juni 2008-Juni 2009).

3.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian lain di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Penelitian tersebut mengenai peran gen HIF1- α pada jaringan otak yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. Penelitian utama tersebut dan penelitian ini menggunakan sampel yang sama sehingga prosedur pengambilan sampel penelitian ini dilakukan bersamaan dengan pengambilan sampel penelitian utama tersebut. Peneliti hanya mendapatkan sampel setelah dilakukan perlakuan serta pengambilan sampel (organ tikus percobaan) di Lakespra Saryanto dan dibawa ke Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI.

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur Wistar berumur 8 (delapan) minggu dengan berat badan 150-250 mg sebagai hewan percobaan. Hewan percobaan kemudian dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan mendapat perlakuan hipoksia hipobarik (dalam *hypobaric chamber*).

Kelompok perlakuan dibagi 4 (empat) kelompok sesuai dengan banyaknya prosedur pemajanan dengan hipoksia hipobarik, yaitu kelompok I (terpapar 1 (satu) kali hipoksia hipobarik ILA awal *type I chamber flight profile*), kelompok II (terpapar dua kali hipoksia hipobarik, yaitu satu kali seperti kelompok I di atas dan 1 kali ILA penyegaran *type II chamber flight profile* untuk penerbang angkut), kelompok III (terpapar tiga kali hipoksia hipobarik, yaitu seperti kelompok II ditambah satu kali *type II chamber flight profile* untuk penerbang pengangkut), dan terakhir kelompok IV (terpapar 4 kali hipoksia, yaitu seperti kelompok III ditambah satu kali *type II chamber flight profile* untuk penerbang angkut). Interval untuk setiap perlakuan adalah 7 (tujuh) hari.

Semua hewan percobaan dipelihara sesuai kondisi standar pencahayaan (06.00-18.00) dan temperatur (22°C) serta mendapat minum dan makan *ad libitum*. Pada hari ke-1, 8, 15, dan 22 sesuai dengan kelompok secara bertahap beberapa hewan percobaan dimasukkan ke dalam *hypobaric chamber*, mendapatkan perlakuan sesuai protokol di atas, kemudian diambil dari kandang perlakuan, dilakukan anestesi dengan eter, ditimbang dan dimatikan. Setelah itu jantung diambil dan ditimbang.

3.4 Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

Kriteria inklusi adalah tikus percobaan tampak sehat yang mendapat perlakuan lengkap sesuai protokol di atas dan memenuhi keadaan hipoksia hipobarik dengan melihat hasil analisis gas darah (hipoksia jika saturasi oksigen <95%). Kriteria eksklusi adalah tikus percobaan yang tidak mendapat perlakuan lengkap sesuai protokol yang ditentukan, tidak memenuhi keadaan hipoksia hipobarik serta telah mati sebelum mendapat perlakuan sesuai protokol di atas.

3.5 Besar Sampel

Jumlah hewan coba pada penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu: $(t-1)(n-1) > 15$

Pada rumus tersebut, t adalah jumlah perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap kelompok perlakuan. Dengan rumus ini didapat jumlah sampel untuk masing-masing kelompok adalah minimal 5 (lima) ekor tikus. Total adalah 25 ekor tikus.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Identifikasi Variabel

Dalam penelitian ini digunakan variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikat yang diteliti ialah aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus percobaan. Sedangkan variabel bebas ialah keadaan hipoksia hipobarik akut berulang.

3.6.2 Bahan dan Alat

3.6.2.1 Bahan

- a. Sampel jaringan hati sesuai kriteria yang ditetapkan
- b. H_2O_2 30% Merck
- c. Phosphate Buffer Saline (PBS)
- d. Na_2HPO_4 Merck
- e. KH_2PO_4 Merck
- f. NaCl Merck
- g. Aquabidest
- h. Bovine Serum Albumine (BSA) Merck
- i. Dan lain-lain

3.6.2.2 Alat

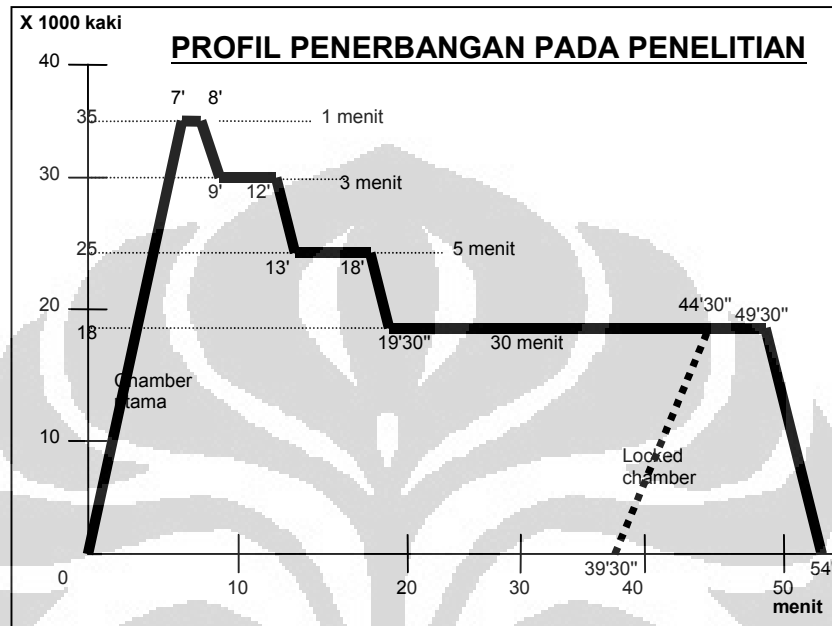
- a. Neraca analitik
- b. Mikropipet volume 0.5-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl
- c. Tip mikropipet 10 μl , 100 μl , 1000 μl
- d. Mikrotube 1.5 ml dan 2 mL

- e. Alat sentrifugasi Hettich
- f. *Micropestle*
- g. *Freezer -80°C*
- h. Spektrofotometer UV (Shimadzu)
- i. Kuvet kaca
- j. Alat-alat laboratorium (gelas gelas kimia, pipet, pinset, sendok, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, botol penyimpanan larutan, dll)
- k. Rak tabung
- l. Alumunium foil
- m. Sarung tangan karet
- n. Alat tulis menulis

3.6.3 Perlakuan Hipoksia Hipobarik

- a. Tikus percobaan dimasukkan ke dalam *hypobaric chamber*.
- b. Dibuat perlakuan hipoksia akut selama 1 menit dengan dilakukan simulasi naik dari ketinggian 0 m (setinggi permukaan laut, *ground level*) ke ketinggian 35,000 kaki dengan *rate of ascent* 5,000 kaki/menit.
- c. Dibuat perlakuan hipoksia akut selama 3 menit dengan dilakukan simulasi turun dari ketinggian 35,000 kaki ke ketinggian 30,000 kaki dengan *rate of descent* 5,000 kaki/menit.
- d. Dilakukan simulasi turun dari ketinggian 30,000 kaki ke ketinggian 18,000 kaki dengan *rate of descent* 5000 kaki/menit. Ketinggian 18,000 kaki dipertahankan selama 30 menit untuk perlakuan hipoksia selama 30 menit. Tikus yang akan diberi perlakuan hipoksia hipobarik berulang tetap berada dalam *hypobaric chamber* hingga prosedur *hypobaric chamber* selesai, namun tidak dibedah.
- e. Di *setting* ketinggian 18.000 kaki, setelah mencapai menit ke-20, segera petugas yang akan melakukan bedah tikus masuk ke *locked chamber*, dan naik ke ketinggian 18,000 kaki dengan *rate of ascent* 4,000 – 5,000 kaki/menit. Pada menit ke 25, petugas masuk ke ruangan *hypobaric chamber* utama untuk persiapan pembedahan tikus dengan

segera menggunakan masker oksigen 100% di *chamber* utama yang harus tetap dipakai selama proses pembedahan. (lampiran 1)



Gambar 3.1. Profil Penerbangan pada Penelitian

3.6.4 Pengambilan Sampel

- Di dalam *hypobaric chamber* dengan *setting* ketinggian 18,000 kaki, 7 (tujuh) ekor tikus dibius total dengan anestesia dalam dengan dimasukkan moncongnya ke dalam kontainer khusus berisi eter cair selama 1 s.d. 2 menit.
- Tikus yang telah berada dalam keadaan terbius ditimbang, kemudian dilakukan bedah tikus sesuai protokol untuk diambil organ hati dari masing-masing tikus.
- Sampel dimasukkan ke dalam kotak pendingin berisi es kering (*dry ice*)
- Segera setelah pembedahan selesai dilakukan, dilakukan simulasi turun dari ketinggian 18,000 kaki ke ketinggian 0 kaki dengan *rate of descent* 4,000 kaki/menit.

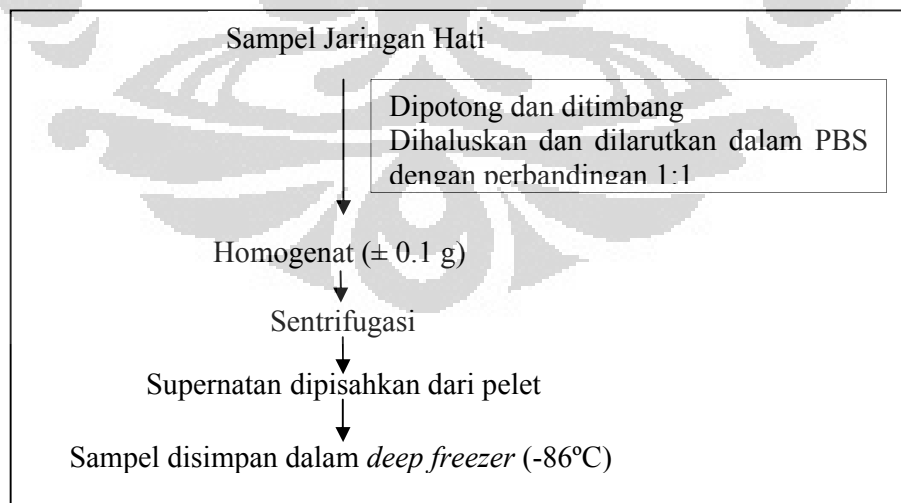
- e. Sampel segera dikirimkan ke Laboratorium Biomolekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.6.5 Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0.05 M dengan pH 7. Sebanyak 5.4376 g Na_2HPO_4 ditambah dengan 2.6469 g KH_2PO_4 dan 2.250 g NaCl, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga volumenya mencapai 500 ml. Selanjutnya diukur pH larutan dengan menggunakan pH meter hingga diperoleh pH 7.

3.6.6 Pembuatan Homogenat Sampel

Sampel jaringan hati yang telah diambil dari tikus percobaan dipotong menjadi ukuran-ukuran kecil kemudian ditimbang. Dibuat homogenat dengan ditambahkan dengan PBS pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan *micropestle*. Setelah itu, homogenat yang telah dibuat disentrifugasi menggunakan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian dipisahkan supernatan dari pelet. Sampel lalu disimpan di *deep freezer* (-86°C) hingga siap untuk digunakan.



Gambar 3.2. Bagan Pembuatan Homogenat Jaringan

3.6.7 Optimasi Pengukuran

Pengukuran aktivitas spesifik katalase ini menggunakan metode Mates et al (1999) yang dioptimasi kembali sehingga pengukuran optimal pada setiap langkah harus ditentukan terlebih dahulu.

3.6.7.1 Penentuan Absorbansi Pengenceran H₂O₂ yang Optimal

Pada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler telah dilakukan penentuan absorbansi pengenceran H₂O₂ yang optimal pada bulan Agustus 2008. Dari hasil tersebut, absorbansi H₂O₂ 30% yang optimal jika diukur dengan spektrofotometri didapatkan pada pengenceran H₂O₂ : pelarut = 1 : 4000.

3.6.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler telah dilakukan penentuan absorbansi pengenceran H₂O₂ yang optimal pada bulan Agustus 2008. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa panjang gelombang maksimum untuk melakukan pengukuran H₂O₂ 30% adalah pada panjang gelombang 210 nm.

3.6.7.3 Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H₂O₂ oleh blanko setiap menit selama 10 menit. Dilakukan juga pengukuran absorbansi H₂O₂ oleh sampel setiap menit selama 10 menit, sampel yang digunakan adalah sampel dengan pengenceran rendah dan tinggi.

Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan memipetkan ke dalam kuvet 950 µL larutan H₂O₂ dengan pengenceran optimal, kemudian ditambahkan dengan 50 µL pelarut, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimal. Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 µL sampel ditambahkan pada 950 µL H₂O₂ dengan pengenceran optimal, untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko.

Selanjutnya penguraian H₂O₂, baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangkan absorbansi di awal (t_0) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan

dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi setiap menit sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel dan dibuat kurvanya.

3.6.7.4 Penentuan Pengenceran Optimal Sampel

Dibuat pengenceran bertingkat pada homogenat sampel dengan PBS 0.05 M dengan perbandingan 1 :100, 1 :500, 1 :1000, 1 :2000, 1 :4000. Dilakukan pengukuran serapan sampel dengan prosedur serupa dengan pengukuran pada tahap sebelumnya (penentuan kinetik katalase), dimulai dari t_0 hingga t_x (waktu optimum). Hasil pengukuran dicatat dalam bentuk tabel dan dibuat kurvanya.

3.6.8 Penentuan Kadar Protein

3.6.8.1 Penentuan Kurva Standar Protein

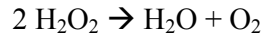
Untuk menentukan kurva standar protein, ditimbang 50 mg BSA untuk kemudian dilarutkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:1. Larutan BSA kemudian diencerkan dengan perbandingan 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 untuk selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel dan dibuat kurvanya. Dari kurva tersebut dicari rumus

3.6.8.2 Penentuan Konsentrasi Protein Hati

Untuk menentukan konsentrasi protein pada hati, dilakukan pengukuran absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada perbandingan 1 :500 pada panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel. Konsentrasi protein (mg/ml homogenat) hati kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel.

3.6.9 Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

Katalase adalah antioksidan enzimatik yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan molekul O_2 .



Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7,0 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase. Perhitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut: Aktivitas Katalase (Unit/ ml) =

$$\frac{(\Delta \text{ Absorbansi Uji} - \Delta \text{ Absorbansi Blanko}) / \text{menit}}{(\text{molaritas } \text{H}_2\text{O}_2) \times (\text{volume sampel yang diukur})} \times \text{faktor pengenceran}$$

Hasil perhitungan tersebut kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase (U/mg protein). Semua hasil dicatat dalam tabel.

$$\text{Aktivitas spesifik katalase (U/mg prot)} = \frac{\text{Aktivitas Katalase (U/mL)}}{\text{Kadar Protein dalam Sampel (mg/mL)}}$$

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Semua hasil perhitungan aktivitas spesifik katalase (Unit/mg) dicatat dan diolah dengan uji statistik dalam program *Microsoft Excel* dan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Pada penelitian ini dilakukan analisa statistik untuk uji hipotesis komparatif skala pengukuran numerik lebih dari 2 kelompok data tak berpasangan. Jika sebaran data normal menurut uji normalitas Shapiro-Wilk, digunakan metode uji *anova*. Jika sebaran data tidak normal, digunakan metode uji Kruskal-Wallis.

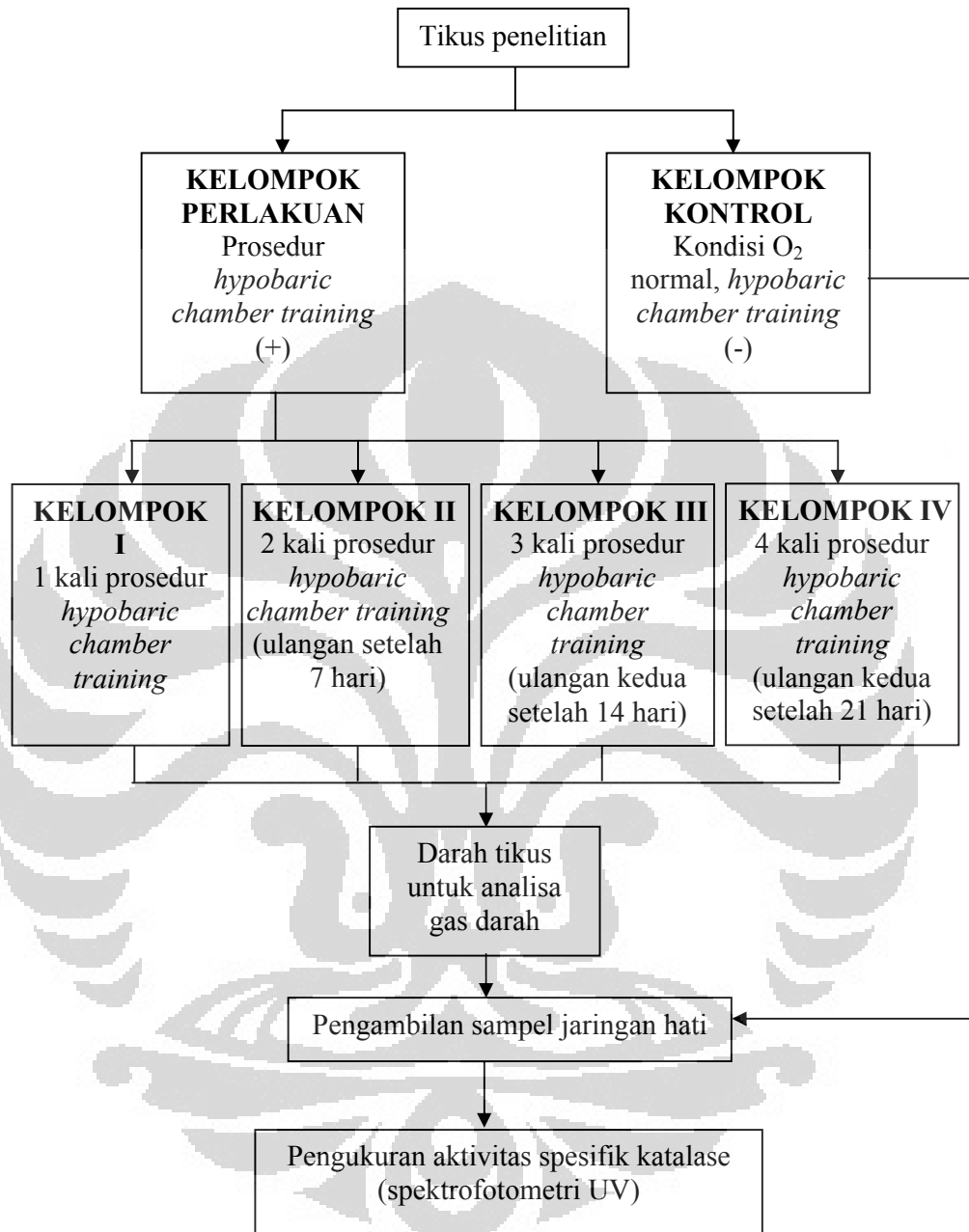
3.8 Pelaporan Data

Data disusun dalam bentuk laporan penelitian yang selanjutnya akan dipresentasikan kepada staf pengajar Modul Riset Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.9 Definisi Operasional

- a. 1 Unit (U) : jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi 1 μmol substrat per menit.
- b. Aktivitas spesifik katalase : laju reaksi katalase dalam memecah H_2O_2 ; jumlah H_2O_2 yang terurai per mg katalase dalam sampel, per satuan waktu.
- c. Hipobaria : tekanan lebih rendah dari tekanan atmosfer ($1 \text{ atm} = 760 \text{ Torr} = 101,325 \text{ Pa} = 1.01325 = \text{FiO}_2 21\%$).
- d. Hipoksia hipobarik : keadaan dimana saturasi oksigen di bawah 95% akibat paparan ketinggian 9750 kaki di atas permukaan laut.
- e. Akut berulang : paparan hipoksia hipobarik yang terjadi segera dan berulang yang diinterupsi oleh periode normoksia dengan interval 7 hari.
- Waktu pemberian perlakuan (hari) = $(1+n), (1+2n), \dots$
 $n = 7$

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3. Bagan Alur Penelitian

BAB 4 HASIL

4.1 Ekstraksi Sampel

Sampel jaringan hati yang telah diambil dipotong kemudian ditimbang. Dibuat homogenat dengan ditambahkan dengan PBS pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan *micropestle*. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet, lalu disimpan di *deep freezer* (-86°C) hingga siap untuk digunakan.

4.2 Optimasi Pengukuran Aktivitas Spesifik Katalase

Pengukuran aktivitas enzim katalase ini menggunakan metode Mates yang dimodifikasi untuk mencari sendiri absorbansi H₂O₂, panjang gelombang, waktu pengukuran, dan pengenceran sampel optimum.

4.2.1 Pengenceran Optimal H₂O₂

Pengenceran optimal H₂O₂ yang digunakan pada penelitian ini menggunakan hasil optimasi yang dilakukan oleh peneliti lain yang juga merupakan bagian dari penelitian mengenai efek perlakuan hipoksia hipobarik pada tikus. Pengenceran H₂O₂ 30% yang digunakan dalam rangkaian penelitian ini adalah 4000 kali.

4.2.2 Panjang Gelombang Maksimal

Panjang gelombang maksimal yang digunakan pada penelitian ini menggunakan hasil optimasi yang dilakukan oleh peneliti lain yang juga merupakan bagian dari penelitian mengenai efek perlakuan hipoksia hipobarik pada tikus. Panjang gelombang yang digunakan dalam rangkaian penelitian ini adalah 210 nm.

4.2.3 Waktu Optimal

Dilakukan pengukuran absorbansi H₂O₂ oleh blanko setiap menit selama 10 menit. Dilakukan juga pengukuran absorbansi H₂O₂ oleh sampel setiap menit selama 10 menit, dan sampel yang digunakan adalah sampel dengan pengenceran

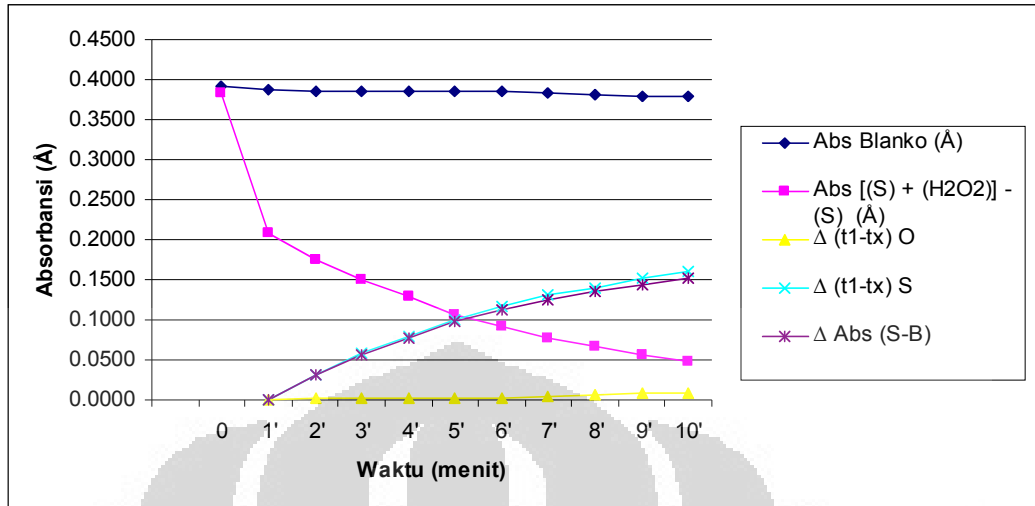
rendah dan tinggi.

Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan memipetkan ke dalam kuvet 950 μL larutan H_2O_2 27.2 μM kemudian ditambahkan dengan 50 μL pelarut, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang 210 nm. Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 μL sampel ditambahkan pada 950 μL H_2O_2 dengan pengenceran optimal, untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko.

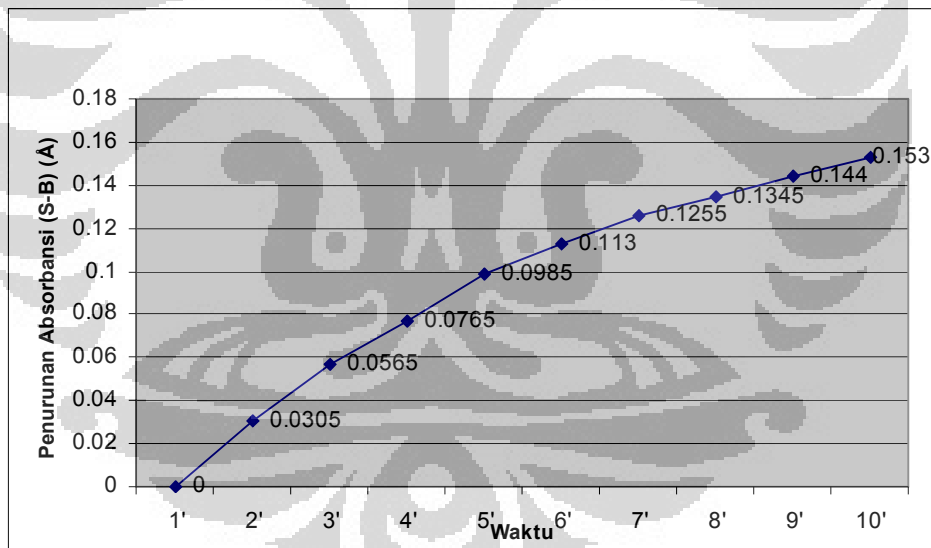
Selanjutnya penguraian H_2O_2 , baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangi absorbansi di awal (t_0) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi setiap menit sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel dan dibuat kurvanya.

Tabel 4.1. Penguraian H_2O_2 oleh Blanko & Sampel tiap Satuan Waktu

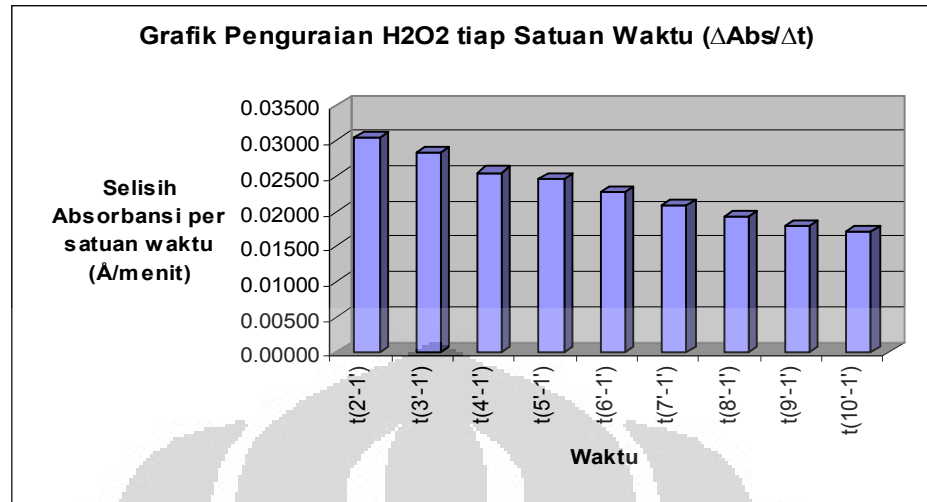
| Waktu | Abs Blanko (\AA) | Abs [(S)+(H ₂ O ₂)] - (S) (\AA) | Δ Abs (t_1-t_x) Blanko | Δ Abs (t_1-t_x) Sampel | Δ Abs (S-B) | Kecepatan reaksi per satuan waktu (\AA /menit) |
|-------|-----------------------------------|--|---|---|-----------------------|---|
| 0 | 0.392 | 0.384 | | | | |
| 1' | 0.388 | 0.208 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | |
| 2' | 0.386 | 0.176 | 0.002 | 0.032 | 0.031 | 0.0305 |
| 3' | 0.386 | 0.150 | 0.002 | 0.058 | 0.057 | 0.0282 |
| 4' | 0.386 | 0.130 | 0.002 | 0.079 | 0.077 | 0.0255 |
| 5' | 0.385 | 0.107 | 0.003 | 0.101 | 0.099 | 0.0246 |
| 6' | 0.385 | 0.092 | 0.003 | 0.116 | 0.113 | 0.0226 |
| 7' | 0.383 | 0.078 | 0.005 | 0.131 | 0.126 | 0.0209 |
| 8' | 0.382 | 0.068 | 0.006 | 0.141 | 0.135 | 0.0192 |
| 9' | 0.380 | 0.057 | 0.008 | 0.152 | 0.144 | 0.0180 |
| 10' | 0.380 | 0.048 | 0.008 | 0.161 | 0.153 | 0.0170 |



Gambar 4.1. Grafik Penguraian H_2O_2 oleh Sampel & Blanko tiap Satuan Waktu



Gambar 4.2. Grafik Penguraian H_2O_2 oleh (S-B) pada tiap Satuan Waktu



Gambar 4.3. Grafik Kecepatan Penguraian H₂O₂ oleh Sampel tiap Satuan Waktu

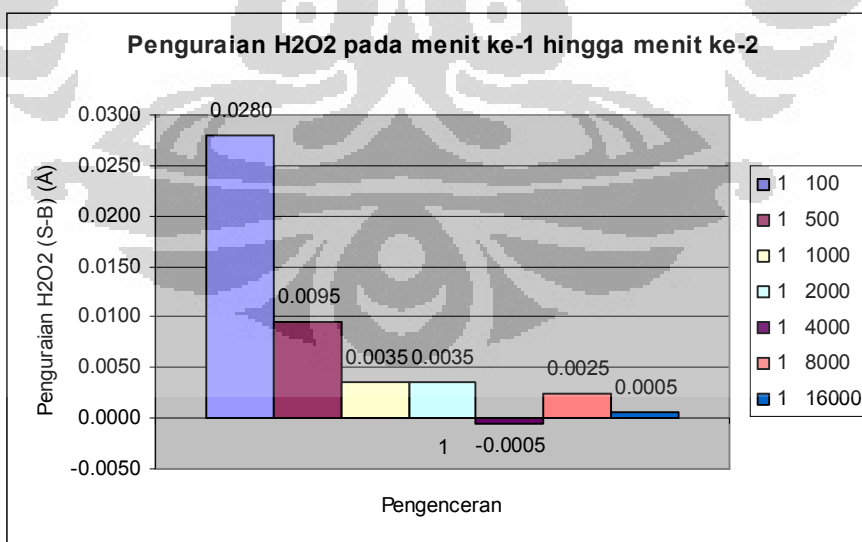
Dari optimasi waktu didapatkan bahwa penguraian terbaik H₂O₂ oleh sampel dicapai pada menit ke-1 hingga menit ke-2, dengan selisih absorbansi 0.031 Å. Dari penghitungan kecepatan reaksi tiap satuan waktu yang didapat dari perbandingan selisih serapan dengan lama waktu pengukuran sejak menit ke-1 didapatkan kecepatan reaksi terbesar adalah pada menit ke-1 menuju ke menit ke-2, dengan kecepatan 0.0305 Å/menit.

Menit ke-1 dijadikan waktu awal (t_0) karena penambahan 50 µL sampel ke dalam 950 µL H₂O₂ dilakukan setelah menit ke-0 sehingga pada menit ke-1 absorbansi meningkat karena pengaruh absorbansi sampel. Untuk mengurangi kerancuan selisih serapan akibat penambahan sampel, serapan diukur sejak menit ke-1.

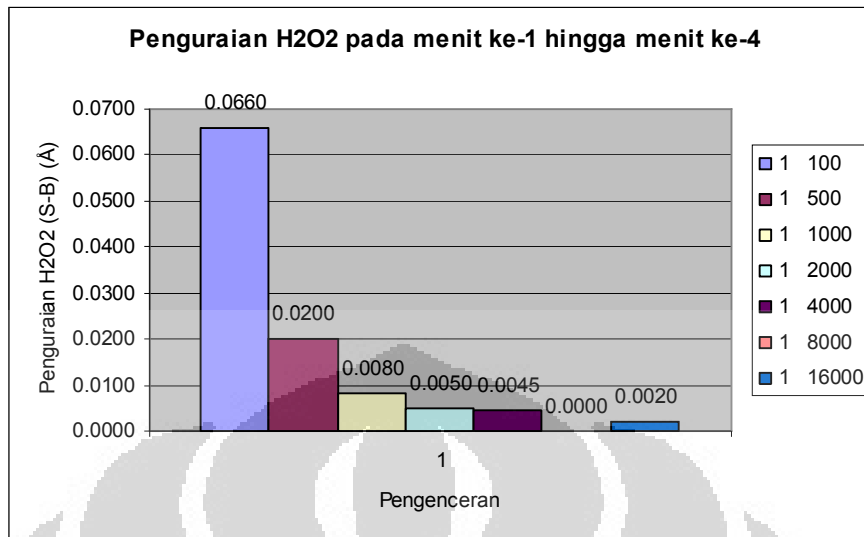
4.2.4 Pengenceran Optimal Sampel Hati

Tabel 4.2. Selisih Serapan Sampel dan Blanko pada Berbagai Pengenceran Sampel

| Absorbansi (\AA) | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| Waktu | 1 : 100 | | 1 : 500 | | 1 : 1000 | | 1 : 2000 | |
| | A | Blanko | B | Blanko | C | Blanko | D | Blanko |
| 0' | 0.3570 | 0.3645 | 0.3615 | 0.3645 | 0.363 | 0.3645 | 0.3545 | 0.3645 |
| 1' | 0.4030 | 0.3475 | 0.363 | 0.3475 | 0.3635 | 0.3475 | 0.354 | 0.3475 |
| 2' | 0.3745 | 0.347 | 0.353 | 0.347 | 0.3595 | 0.347 | 0.35 | 0.347 |
| 4' | 0.3365 | 0.347 | 0.3425 | 0.347 | 0.355 | 0.347 | 0.3485 | 0.347 |
| Δ Abs (t1-t12) | 0.0285 | 0.0005 | 0.0100 | 0.0005 | 0.0040 | 0.0005 | 0.0040 | 0.0005 |
| Δ Abs (t1-t14) | 0.0665 | 0.0005 | 0.0205 | 0.0005 | 0.0085 | 0.0005 | 0.0055 | 0.0005 |
| Δ Abs (t1-t12) (S-B) | 0.0280 | | 0.0095 | | 0.0035 | | 0.0035 | |
| Δ Abs (t1-t14) (S-B) | 0.0660 | | 0.0200 | | 0.0080 | | 0.0050 | |
| Absorbansi (\AA) | | | | | | | | |
| Waktu | 1 : 4000 | | 1 : 8000 | | 1 : 16000 | | | |
| | E | Blanko | F | Blanko | G | Blanko | | |
| 0' | 0.3675 | 0.3645 | 0.3555 | 0.3645 | 0.3655 | 0.3645 | | |
| 1' | 0.3625 | 0.3475 | 0.3505 | 0.3475 | 0.363 | 0.3475 | | |
| 2' | 0.3625 | 0.347 | 0.3475 | 0.347 | 0.362 | 0.347 | | |
| 4' | 0.3575 | 0.347 | 0.35 | 0.347 | 0.3605 | 0.347 | | |
| Δ Abs (t1-t12) | 0 | 0.0005 | 0.003 | 0.0005 | 0.001 | 0.0005 | | |
| Δ Abs (t1-t14) | 0.005 | 0.0005 | 0.0005 | 0.0005 | 0.0025 | 0.0005 | | |
| Δ Abs (t1-t12) (S-B) | -0.0005 | | 0.0025 | | 0.0005 | | | |
| Δ Abs (t1-t14) (S-B) | 0.0045 | | 0.0000 | | 0.0020 | | | |



Gambar 4.4 Grafik Penguraian H₂O₂ pada Menit ke-1 (t_0) hingga Menit ke-2



Gambar 4.5. Grafik Penguraian H₂O₂ pada Menit ke-1 (t_0) hingga Menit ke-4

Dari pengukuran penguraian H₂O₂ pada menit ke-1 (t_0) hingga menit ke-4 didapatkan bahwa penguraian terbesar yang dinyatakan dengan selisih serapan (Δ absorbansi (S-B)), baik dari menit ke-1 hingga menit ke-2 maupun dari menit ke-1 hingga menit ke-2 berlangsung pada sampel jaringan hati dengan pengenceran 1:100. Dari kedua grafik tampak bahwa dengan semakin tingginya pengenceran, penguraian H₂O₂ semakin menurun, sehingga dapat disimpulkan bahwa efektivitas katalase berbanding lurus dengan kadarnya.

Pada pengenceran rendah (1:100, 1:500, dan 1:1000) tampak absorbansi di menit ke-1 lebih tinggi daripada absorbansi di menit ke-0, dikarenakan faktor pekatnya sampel. Untuk mengurangi kerancuan, dapat diukur serapan sampel murni (tanpa H₂O₂), atau, sebagaimana diterapkan pada penelitian ini, menjadikan menit ke-1 sebagai t_0 .

4.3 Aktivitas Katalase Sampel

Aktivitas enzim merupakan pengukuran kuantitas enzim dalam preparat yang dinyatakan dalam satuan katal/kg atau U/mL atau nmol per menit per mL.⁴⁰⁻
⁴² 1 unit berarti jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi 1 μ mol substrat per menit.

Untuk pengukuran aktivitas katalase sampel, perlu diketahui molaritas larutan H₂O₂. Molaritas H₂O₂ diperoleh melalui perhitungan-perhitungan sebagai berikut:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 30\%} = 30 \text{ g H}_2\text{O}_2 \text{ dalam 100 mL larutan}$$

$$\text{Berat molekul (BM)} = 34 \text{ g/mol}$$

$$\text{Berat jenis} = 1.11 \text{ g/mL}$$

$$10 \text{ mM} = 10 \text{ mmol/L} = 10^{-2} \text{ mol/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume H}_2\text{O}_2 \text{ murni dalam 1 mol larutan H}_2\text{O}_2 \text{ 30\%} &= \frac{34 \text{ g/mol}}{1.11 \text{ g/mL}} \times 30\% \quad (4.1) \\ &= 9.19 \text{ mL/mol} \end{aligned}$$

Volume H₂O₂ murni dalam larutan H₂O₂ agar molaritasnya 10 mM

$$10 \text{ mM} = 9.19 \text{ mL/mol} \times 10^{-2} \text{ mol/L}$$

$$10 \text{ mmol/L} = 0.092 \text{ mL/L}$$

$$10 \text{ mmol} = 92 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$= 92 \text{ }\mu\text{L}$$

$$\text{Larutan H}_2\text{O}_2 \text{ 1:4000} = \frac{1 \text{ mL}}{4000 \text{ mL}} = \frac{1}{4000} = 0.25 \times 10^{-3} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} \text{Molaritas larutan H}_2\text{O}_2 \text{ 1:4000} &= \frac{0.00025}{0.092} \times 10 \text{ mM} \quad (4.3) \\ &= 2.72 \times 10^{-3} \times 10 \text{ mM} \\ &= 27.2 \times 10^{-3} \text{ mM} \\ &= 27.2 \text{ }\mu\text{M} \end{aligned}$$

Diukur absorbansi blanko dengan dipipetkan ke dalam kuvet 950 μL larutan H₂O₂ 27.2 μM , kemudian ditambahkan dengan 50 μL pelarut, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang 210 nm pada menit ke-1 (t_0) dan menit ke-2 (t_1).

Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 μL sampel ditambahkan pada 950 μL H₂O₂ 27.2 μM , untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko.

Selanjutnya penguraian H₂O₂, baik oleh blanko maupun sampel didapat

dengan cara mengurangkan absorbansi pada t_0 dengan absorbansi pada t_1 . Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko ((Δ Absorbansi Uji- Δ Absorbansi Blanko)).

Kemudian dihitung aktivitas katalase dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

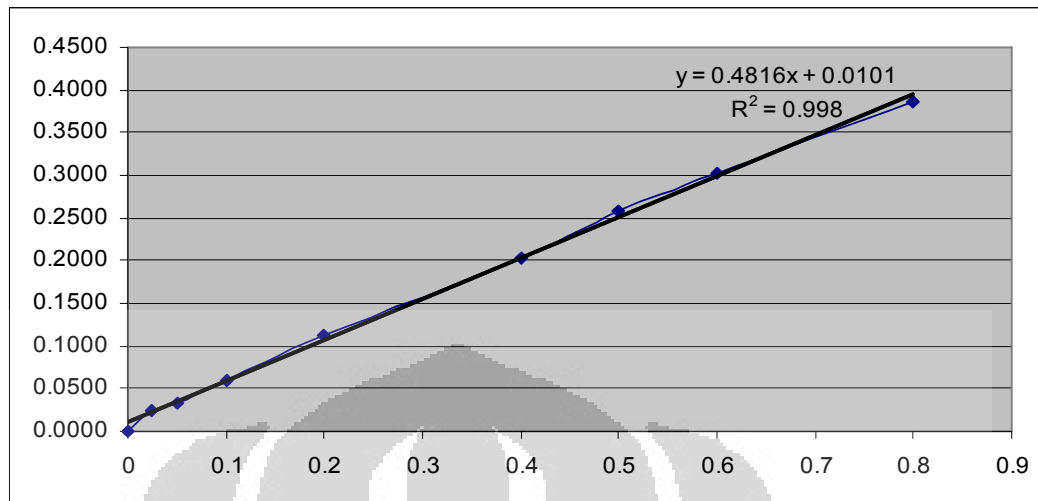
$$\begin{aligned} & \text{Aktivitas katalase (U/mL)} \\ &= \frac{(\Delta \text{ Abs Uji} - \Delta \text{ Abs Blanko})/\text{menit}}{(\text{molaritas } H_2O_2)} \times \text{faktor pengenceran sampel} \times \text{faktor pengenceran ke dalam kuvet} \\ &= \frac{(\Delta A \text{ Uji} - \Delta A \text{ Blanko})/\text{menit}}{2.72} \times 100 \times 20 \end{aligned} \quad (4.4)$$

* 50×10^{-3} didapat dari 50 μL homogenat sampel yang ditambahkan ke dalam 950 μL H_2O_2 27.2 μM hingga tercapai volume 1000 μL untuk pengukuran serapan dengan spektrofotometer.

4.4 Kurva Standar Protein

Tabel 4.3. Absorbansi Standar Protein (BSA)

| Konsentrasi (mg/ml) | Absorbansi 280 nm | | |
|------------------------|-------------------|--------|-----------|
| | A | B | Rata-rata |
| 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 0.025 | 0.0260 | 0.0210 | 0.0235 |
| 0.05 | 0.0330 | 0.0330 | 0.0330 |
| 0.1 | 0.0600 | 0.0600 | 0.0600 |
| 0.2 | 0.1090 | 0.1150 | 0.1120 |
| 0.4 | 0.2000 | 0.2080 | 0.2040 |
| 0.5 | 0.2580 | 0.2600 | 0.2590 |
| 0.6 | 0.3000 | 0.3040 | 0.3020 |
| 0.8 | 0.3820 | 0.3900 | 0.3860 |



Gambar 4.6. Kurva Standar Protein

Kurva standar protein dibuat dan dicari nilai R^2 -nya. Nilai R^2 atau koefisien determinasi merupakan angka yang nilainya berkisar dari 0 sampai 1 yang menunjukkan seberapa dekat nilai perkiraan untuk analisis regresi yang mewakili data sebenarnya. Analisis regresi paling dapat dipercaya jika nilai R^2 sama dengan atau mendekati 1. dari hasil kurva standar protein diperoleh nilai R^2 sebesar 0.998 untuk digunakan dalam perhitungan kadar protein jaringan.

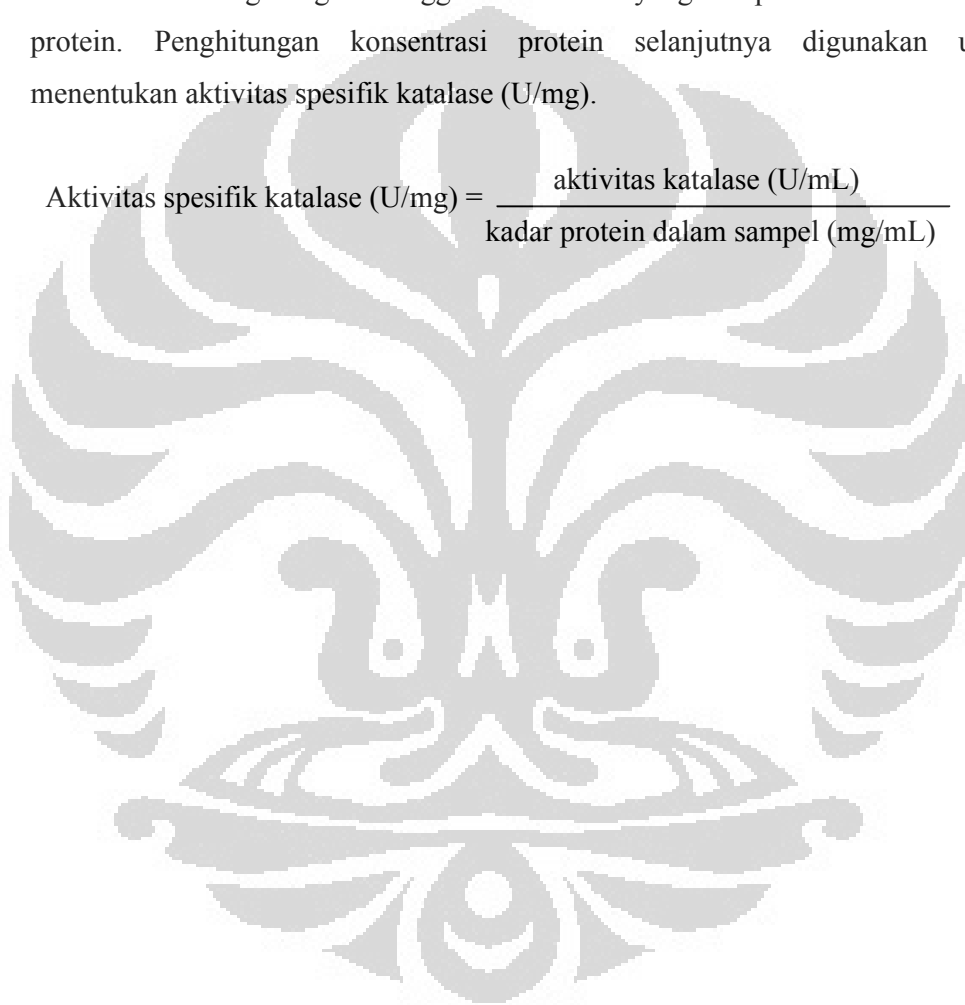
4.5 Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

Aktivitas spesifik menyatakan jumlah molekul substrat yang dikonversi per satuan waktu per unit massa enzim.^{40,41} Nilai aktivitas spesifik enzim didapat dari perbandingan aktivitas enzim terhadap massa enzim dalam jaringan (*actual mass of enzyme present*), yang dinyatakan dengan katal/kg (satuan internasional) atau $\mu\text{mol}/\text{mg}$ menit atau $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ menit.^{40,41} Aktivitas spesifik suatu enzim menyatakan kemurnian atau efisiensi enzim tersebut. Semakin murni preparat enzim, semakin besar nilai aktivitas spesifiknya, semakin efisien enzim tersebut bekerja, karena jumlah protein (mg) semakin kecil, namun laju reaksi tetap sama (atau meningkat karena berkurangnya interferensi dari inhibitor enzim tersebut).⁴² Enzim murni memiliki nilai aktivitas spesifik 100%. Selanjutnya, nilai kemurnian

sampel dapat diketahui dengan membandingkan aktivitas spesifik enzim pada sampel terhadap aktivitas spesifik enzim murni.⁴⁰

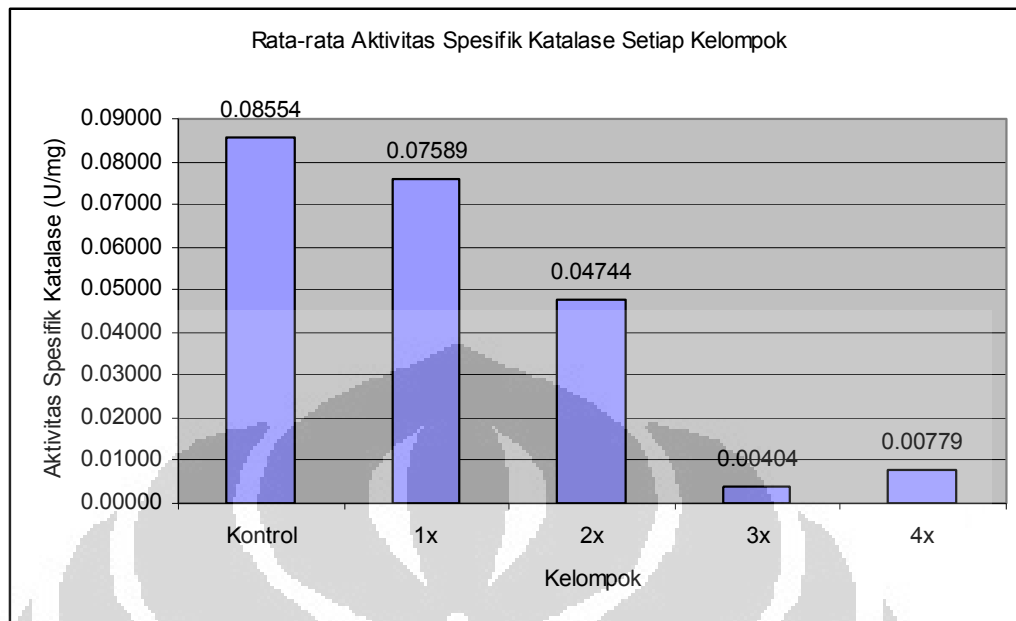
Untuk penentuan aktivitas spesifik katalase dalam tiap sampel, diukur konsentrasi protein setiap sampel. Pengukuran absorbansi protein sampel dilakukan pada hari yang sama dengan pembuatan kurva standar protein. Diukur serapan sampel pada panjang gelombang 280 nm. Konsentrasi protein (mg/mL) kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Penghitungan konsentrasi protein selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase (U/mg).

$$\text{Aktivitas spesifik katalase (U/mg)} = \frac{\text{aktivitas katalase (U/mL)}}{\text{kadar protein dalam sampel (mg/mL)}} \quad (4.5)$$



Tabel 4.4. Aktivitas Spesifik Katalase

| Sampel | ($\Delta AU - \Delta AS$) (\AA) | Aktivitas Katalase (U/mL) | Absorbansi Protein Sampel (\AA) | Kadar Protein dalam Homogenat (mg/mL) | Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg) | Rata-rata Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg) |
|--------|---|---------------------------------|--|---|---|--|
| K1 | 0.0295 | 2.1691 | 0.1310 | 25.1038 | 0.0864 | |
| K2 | 0.0295 | 2.1691 | 0.1350 | 25.9344 | 0.0836 | |
| K3 | 0.0435 | 3.1985 | 0.2145 | 42.4419 | 0.0754 | 0.08554 |
| K4 | 0.0410 | 3.0147 | 0.1800 | 35.2782 | 0.0855 | |
| K5 | 0.0470 | 3.4559 | 0.1820 | 35.6935 | 0.0968 | |
| E1 | 0.0275 | 2.0221 | 0.1685 | 32.8904 | 0.0615 | |
| E2 | 0.0300 | 2.2059 | 0.1320 | 25.3115 | 0.0871 | |
| E3 | 0.0370 | 2.7206 | 0.1470 | 28.4261 | 0.0957 | 0.07589 |
| E4 | 0.0275 | 2.0221 | 0.1280 | 24.4809 | 0.0826 | |
| E5 | 0.0275 | 2.0221 | 0.1955 | 38.4967 | 0.0525 | |
| F1 | 0.0225 | 1.6544 | 0.1735 | 33.9286 | 0.0488 | |
| F2 | 0.0120 | 0.8824 | 0.1520 | 29.4643 | 0.0299 | |
| F3 | 0.0295 | 2.1691 | 0.2180 | 43.1686 | 0.0502 | 0.04744 |
| F4 | 0.0270 | 1.9853 | 0.2030 | 40.0540 | 0.0496 | |
| F5 | 0.0265 | 1.9485 | 0.1700 | 33.2018 | 0.0587 | |
| G1 | 0.0035 | 0.2574 | 0.1495 | 28.9452 | 0.0089 | |
| G2 | 0.0010 | 0.0735 | 0.1300 | 24.8962 | 0.0030 | |
| G3 | 0.0010 | 0.0735 | 0.1955 | 38.4967 | 0.0019 | 0.00404 |
| G4 | 0.0015 | 0.1103 | 0.1930 | 37.9776 | 0.0029 | |
| G5 | 0.0020 | 0.1471 | 0.2100 | 41.5075 | 0.0035 | |
| H1 | 0.0005 | 0.0368 | 0.1695 | 33.0980 | 0.0011 | |
| H2 | 0.0005 | 0.0368 | 0.1710 | 33.4095 | 0.0011 | |
| H3 | 0.0030 | 0.2206 | 0.1730 | 33.8248 | 0.0065 | 0.00779 |
| H4 | 0.0075 | 0.5515 | 0.1060 | 19.9128 | 0.0277 | |
| H5 | 0.0010 | 0.0735 | 0.1500 | 29.0490 | 0.0025 | |



Gambar 4.7. Grafik Rata-rata Aktivitas Spesifik Katalase Setiap Kelompok

Dari hasil pengukuran dan penghitungan aktivitas katalase didapatkan bahwa aktivitas spesifik katalase pada kelompok kontrol memiliki nilai rata-rata tertinggi dibandingkan kelompok-kelompok perlakuan, dengan nilai rata-rata aktivitas spesifik katalase pada kelompok kontrol adalah sebesar 0.08554 U/mg, nilai terendah 0.0754 U/mg dan nilai tertinggi 0.0968 U/mg.

Pada penelitian ini didapatkan aktivitas katalase pada jaringan hati tikus pada kelompok-kelompok perlakuan, memberikan gambaran aktivitas spesifik katalase menurun pada keadaan hipoksia.

Nilai rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok dengan 1x perlakuan adalah sebesar 0.07589 U/mg, dengan nilai terendah 0.0525 U/mg dan nilai tertinggi 0.0957 U/mg.

Nilai rata-rata aktivitas spesifik katalase pada kelompok yang mendapat 2x perlakuan adalah sebesar 0.04744 U/mg, dengan nilai terendah 0.0299 U/mg dan nilai tertinggi 0.0587 U/mg.

Nilai rata-rata terendah aktivitas spesifik katalase terdapat pada kelompok yang mendapat 3x perlakuan adalah sebesar 0.00814 U/mg, dengan nilai terendah 0.0019 U/mg dan nilai tertinggi 0.0235 U/mg.

Rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok yang mendapat 4x perlakuan adalah sebesar 0.00463 U/mg, dengan nilai terendah 0.0299 U/mg dan nilai tertinggi 0.0587 U/mg.

4.6 Pengolahan Data dengan Uji Statistik

Dalam penentuan metode uji statistika yang digunakan, perlu ditentukan normalitas sebaran data terlebih dahulu. Secara deskriptif, didapatkan sebaran data yang normal dengan koefisien varian 81.25% (-2 s.d. 2), rasio Skewness 0.1034 (-2 s.d. 2), dan rasio Kurtosis 1.8049 (-2 s.d. 2). Sedangkan berdasar uji normalitas data dengan metode analitik Shapiro-Wilk didapatkan bahwa data tidak berdistribusi normal ($p = 0.004$), dan karenanya tereksklusi untuk dilakukan uji parametrik. Digunakan metode uji nonparametrik untuk lebih dari dua kelompok data tidak berpasangan, Kruskal-Wallis.

Dari uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p = 0.000$, dan dapat ditarik kesimpulan bahwa paling tidak terdapat perbedaan aktivitas katalase antara dua kelompok.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna, dilakukan analisis *post-hoc* dengan metode uji Mann-Whitney.

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1. Optimasi Pengukuran

Menit ke-1 dijadikan waktu awal (t_0) karena penambahan 50 μL sampel ke dalam 950 μL H_2O_2 dilakukan setelah menit ke-0 sehingga pada menit ke-1 absorbansi meningkat karena pengaruh absorbansi sampel. Untuk mengurangi kerancuan selisih serapan akibat penambahan sampel, menit ke-1 dijadikan sebagai waktu awal (t_0).

5.2 Aktivitas Spesifik Katalase

Aktivitas spesifik menyatakan jumlah molekul substrat yang dikonversi per satuan waktu per unit massa enzim.^{47,48} Nilai aktivitas spesifik enzim didapat dari perbandingan aktivitas enzim terhadap massa protein dalam jaringan (*actual mass of enzyme present*), yang dinyatakan dengan katal/kg (satuan internasional) atau $\mu\text{mol}/\text{mg}$ menit atau $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ menit.^{47,48} Aktivitas spesifik suatu enzim menyatakan kemurnian atau efisiensi enzim tersebut. Semakin murni preparat enzim, semakin besar nilai aktivitas spesifiknya, semakin efisien enzim tersebut bekerja, karena jumlah protein (mg) semakin kecil, namun laju reaksi tetap sama (atau meningkat karena berkurangnya interferensi dari inhibitor enzim tersebut).⁴⁹ Enzim murni memiliki nilai aktivitas spesifik 100%. Selanjutnya, nilai kemurnian sampel dapat diketahui dengan membandingkan aktivitas spesifik enzim pada sampel terhadap aktivitas spesifik enzim murni.⁴⁷

Nilai aktivitas spesifik enzim dipilih pada penelitian ini karena dapat memberikan gambaran lebih spesifik mengenai aktivitas enzim, menghindarkan kerancuan terhadap hasil.

5.2.1 Aktivitas Spesifik Katalase pada Jaringan Hati Hipoksik dan Nonhipoksik

Dari perhitungan data didapatkan bahwa aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus yang mengalami hipoksia lebih rendah daripada pada jaringan nonhipoksik, menggambarkan adanya penurunan aktivitas spesifik katalase hati pada keadaan hipoksia. Hal ini sesuai dengan penelitian-penelitian yang dilakukan

Costa (1990), Costa (1993), Nakanishi (1995), Hollander (1998), dan Martin (2002) mengenai pengaruh hipoksia akibat ketinggian pada ekspresi gen serta aktivitas enzim-enzim antioksidan, khususnya katalase, jaringan hati tikus.^{20-23,41} Menurut penelitian yang dilakukan Costa (1990), pada tikus jantan yang diberi pajanan hipoksia hipobarik pada ketinggian 5,500 m selama 35 hari, terjadi penurunan bermakna kadar enzim-enzim antioksidan seperti SOD, katalase, dan glutathion peroksidase, dengan katalase mengalami penurunan 30%.²⁰ Pada penelitian oleh Hollander J, et. al. pada tahun 1998 mengenai pengaruh penerbangan luar angkasa (*spaceflight*) selama 8 hari terhadap tikus, didapatkan penurunan aktivitas katalase hati yang bermakna.⁴¹

Mengenai penurunan aktivitas spesifik katalase terhadap hipoksia hipobarik pada jaringan hati, dapat diajukan beberapa teori.

1. Jaringan hati berespon terhadap inflamasi melalui proses apoptosis.³⁵ Apoptosis merupakan kematian sel terprogram, yang terjadi baik secara fisiologis, adaptif, atau patologik. Salah satu mediator utama pada apoptosis adalah caspase, anggota famili sistein protease yang di dalam sel terdapat dalam bentuk proenzim inaktif.¹⁰ Caspase mengkatalisis hidrolisis protein serta mengaktivasi DNase, menyebabkan pemecahan rantai DNA. Pada apoptosis terjadi pemecahan protein, DNA, atau reaksi fagositik oleh makrofag yang menyebabkan penurunan jumlah sel dan konstituennya, sehingga pada jumlah sel atau kadar suatu zat yang dihasilkan sel tersebut terdeteksi lebih rendah dari jumlah awalnya.¹⁰

Akan tetapi, pada apoptosis, hilangnya seluruh komponen sel akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim (U/mL menit), namun tidak menurunkan aktivitas spesifik enzim tersebut, karena aktivitas spesifik enzim merupakan perbandingan aktivitas enzim terhadap massa protein dalam jaringan (*actual mass of enzyme present*), yang dinyatakan ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ atau $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$).^{47,48}

2. Mekanisme lain yang lebih mungkin dalam menjelaskan penurunan aktivitas spesifik katalase ialah autofagi, sistem degradasi intraseluler melalui proses digesti komponen sel oleh lisosom, yang berperan dalam malih (*turnover*) organel-organel sel yang rusak akibat kerusakan sel dan proses *remodelling*

pada diferensiasi sel.^{10,50,51} Pada autofagi, terbentuk vakuol autofagik yang kemudian berfusi dengan lisosom atau elemen Golgi untuk membentuk autofagolisosom.¹⁰

Berbagai protein konstituen sel yang merupakan target autofagi, katalase termasuk di antaranya. Bahkan, terdapat degradasi selektif katalase via mekanisme ini. Degradasi selektif katalase menyebabkan akumulasi substratnya, H₂O₂. Hipoksia menginduksi ekspresi gen *hypoxic-induced factor* (HIF)-1 α , yang kemudian menginduksi autofagi selektif terhadap katalase pada sel-sel hati,⁵² menyebabkan akumulasi hidrogen peroksida dan semakin memperberat stress oksidatif pada hepatosit. Pada penelitian oleh Yu (2005), didapatkan bahwa pada hipoksia terjadi inhibisi terhadap caspase, menghambat proses apoptosis, sekaligus menginduksi autofagi selektif katalase, dan menyebabkan kematian sel akibat akumulasi spesies oksigen reaktif.^{51,53}

5.2.1.1 Perbandingan Aktivitas Spesifik Katalase Kelompok Kontrol & Perlakuan

Nilai rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok dengan 1x perlakuan adalah 0.07589 U/mg, yaitu sebesar 88.72% rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok kontrol. Menurut uji analitik nonparametrik Mann-Whitney, penurunan aktivitas katalase pada kelompok yang diberi satu kali perlakuan tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan aktivitas pada kelompok kontrol ($p = 0.548$).

Studi yang dilakukan oleh Martin R, et. al. pada tahun 2002 pada tikus jantan Wistar, di mana bahwa hipoksia hipobarik dalam jangka waktu singkat menyebabkan penurunan bermakna ekspresi mRNA hati enzim-enzim antioksidan, termasuk katalase.⁵⁵ Pada penelitian yang dilakukan oleh Nakanishi K, et. al (1995) mengenai efek hipoksia hipobarik pada ketinggian 5,500 m memberikan hasil penurunan bermakna ($p < 0.05$) aktivitas katalase pada hati tikus pada hari pertama.²²

Meskipun berdasarkan aktivitas enzim hasil ini sesuai dengan studi serupa yang dilakukan Martin et. al. (2002) dan Nakanishi (1995), secara statistik

terdapat perbedaan kemaknaan. Perbedaan kemaknaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan prosedur hipoksia hipobarik, yang pada penelitian ini dilakukan bertahap (naik ke ketinggian 35,000 kaki, lalu turun ke ketinggian 30,000 kaki, turun ke ketinggian 25,000 kaki, selanjutnya turun ke dan dipertahankan pada ketinggian 18,000 kaki), *rate of ascent*, durasi waktu pada ketinggian tertentu, temperatur, serta perbedaan ketinggian untuk mencetuskan keadaan hipoksia hipobarik, yang mempengaruhi kecepatan awitan sekaligus beratnya hipoksia.^{2,19} Pada studi yang dilakukan Joanny et. al. (2001), didapatkan bahwa tingkat stress oksidatif paralel dengan peningkatan ketinggian.^{8,18}

Rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 kali semakin menurun sebanding dengan jumlah perlakuan. Nilai rerata aktivitas spesifik katalase pada kelompok yang mendapat 2x perlakuan adalah 0.04744 U/mg (55.46% rerata kelompok kontrol). Rerata aktivitas spesifik katalase kelompok dengan 3 kali perlakuan adalah 0.00814 U/mg (4.74% rerata kelompok kontrol), dan merupakan nilai terendah di antara seluruh kelompok sampel.

Menurut uji statistik, antara kelompok kontrol dan kelompok yang diberi 2 (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik didapatkan perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan ($p = 0.008$). Juga terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik ($p = 0.008$).

Rerata aktivitas katalase kelompok dengan 4 (empat) kali (0.00463 U/mg, 9.11% rerata kelompok kontrol) meningkat dibandingkan rerata kelompok dengan 3 (tiga) kali perlakuan. Meskipun terjadi peningkatan, nilai ini masih berbeda bermakna dibandingkan dengan rerata kelompok kontrol ($p = 0.008$). Menurut penelitian yang dilakukan Nakanishi K, et. al (1995) mengenai efek hipoksia hipobarik pada ketinggian 5,500 m, setelah mengalami penurunan pada hari pertama, pada waktu selanjutnya aktivitas katalase didapatkan kembali ke nilai semula.²² Peningkatan kembali aktivitas katalase ini mungkin merupakan respon jaringan terhadap hipoksia akut berulang dengan frekuensi tinggi yang menyerupai respon terhadap hipoksia kronik. Pada penelitian yang dilakukan Leon-Velarde et. al. (1984), diberikan simulasi hipoksia kronik untuk memicu aklimatisasi tikus uji dengan pemberian paparan hipoksia hipobarik intermiten

selama 20 jam sehari, 6 hari seminggu. Pada penelitian tersebut tidak didapatkan perbedaan bermakna pada kapasitas fosforilasi oksidatif mitokondria jaringan hati tikus dibandingkan dengan sampel kontrol pada ketinggian 0 m.⁵⁴ Pada penelitian oleh Costa pada tahun 1993, pada tikus betina yang diberi perlakuan ketinggian tersimulasi (*simulated altitude*) di ketinggian 4,400 m selama 2 bulan, dinyatakan bahwa aktivitas katalase jaringan hati tidak mengalami penurunan bermakna dengan perlakuan hipoksia hipobarik kronik tersebut.²⁰ Pada kelompok dengan 4 kali perlakuan, terdapat perbedaan bermakna dengan penelitian yang dilakukan Costa (1993) tersebut.²⁰ Perbedaan bermakna ini mungkin disebabkan belum adekuatnya respon adaptasi jaringan hati tikus.

5.2.1.2 Perbandingan antar Kelompok Perlakuan

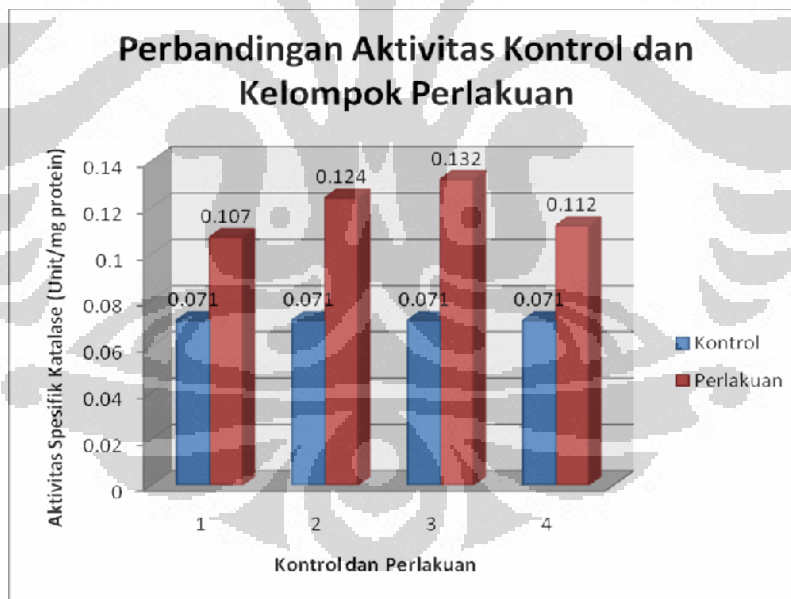
Berdasar uji Mann-Whitney pada kelompok dengan 1 (satu) kali perlakuan dan 2 (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik, terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang bermakna antara kedua kelompok ($p = 0.016$). Antara kelompok dengan 1 (satu) kali perlakuan dan 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan ($p = 0.008$). Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang bermakna antara kelompok yang diberi 1 (satu) kali perlakuan dengan kelompok yang diberi 4 (empat) kali perlakuan ($p = 0.008$).

Antara kelompok dengan 2 (dua) kali perlakuan dan 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan ($p = 0.008$). Dari uji antara kelompok dengan 2 (dua) kali perlakuan dan 4 (empat) kali perlakuan hipoksia hipobarik didapatkan perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan ($p = 0.008$).

Sedangkan pada kelompok dengan 3 (tiga) kali Perlakuan dan 4 (empat) kali Perlakuan Hipoksia Hipobarik tidak terdapat perbedaan bermakna aktivitas spesifik katalase ($p = 0.69$).

5.3. Perbandingan dengan Hasil Penelitian Serupa pada Sampel Jaringan Ginjal

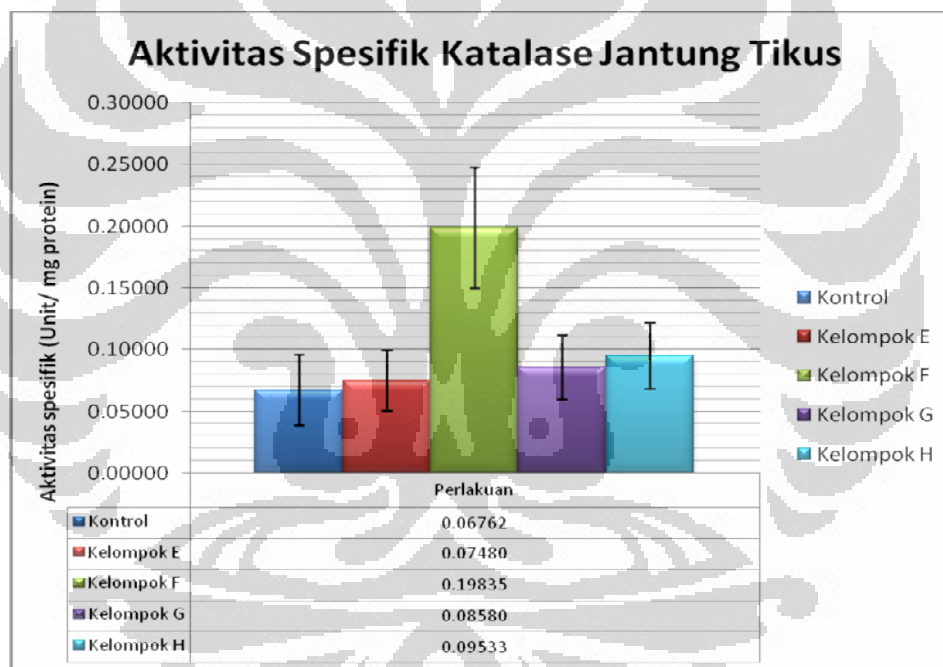
Pada rangkaian penelitian ini juga dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase pada jaringan ginjal dengan perlakuan serupa yang dilakukan oleh Anatriera RA di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tahun 2009. Sampel jaringan ginjal berasal dari individu tikus yang sama dengan sampel jaringan hati. Pada penelitian tersebut didapatkan rerata aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal meningkat pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Hasil ini berlawanan dengan hasil yang didapatkan pada penelitian dengan sampel hati. Kontradiksi kedua hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Martin et. al. (2002) bahwa hipoksia hipobarik dalam waktu singkat menyebabkan penurunan ekspresi gen enzim-enzim antioksidan di hati, namun meningkatkan ekspresi gen enzim-enzim serupa pada jaringan ginjal.⁵⁵



Gambar 5.1. Grafik Aktivitas Spesifik Katalase Pada Jaringan Ginjal yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

5.4. Perbandingan dengan Hasil Penelitian Serupa pada Sampel Jaringan Jantung

Selain penelitian serupa pada jaringan ginjal, pada penelitian rangkaian penelitian ini juga dilakukan penelitian mengenai aktivitas spesifik katalase pada jaringan jantung tikus dengan sumber sampel dari individu tikus yang sama. Penelitian dilakukan oleh Febrianti S di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tahun 2009. Pada penelitian tersebut didapatkan rerata aktivitas spesifik katalase jaringan jantung meningkat pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Hasil ini berlawanan dengan hasil yang didapatkan pada penelitian dengan sampel hati.



Gambar 5.2. Grafik Aktivitas Spesifik Katalase Pada Jaringan Jantung yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Dari perhitungan data didapatkan bahwa aktivitas spesifik katalase pada semua kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan pada kelompok kontrol. Terjadi penurunan aktivitas spesifik katalase jaringan hati tikus pada keadaan hipoksia.
2. Tidak terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi 1 (satu) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
3. Terdapat penurunan aktivitas spesifik katalase yang signifikan pada kelompok yang diberi 2 (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik dibandingkan dengan kelompok Kontrol.
4. Terdapat penurunan aktivitas spesifik katalase yang signifikan pada kelompok yang diberi 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik dibandingkan dengan kelompok Kontrol.
5. Terdapat penurunan aktivitas spesifik katalase yang signifikan pada kelompok yang diberi 4 (empat) kali perlakuan hipoksia hipobarik dibandingkan dengan kelompok Kontrol.
6. Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 1 (satu) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
7. Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 1 (satu) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
8. Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 1 (satu) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi 4 (empat) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
9. Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 2 (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik.

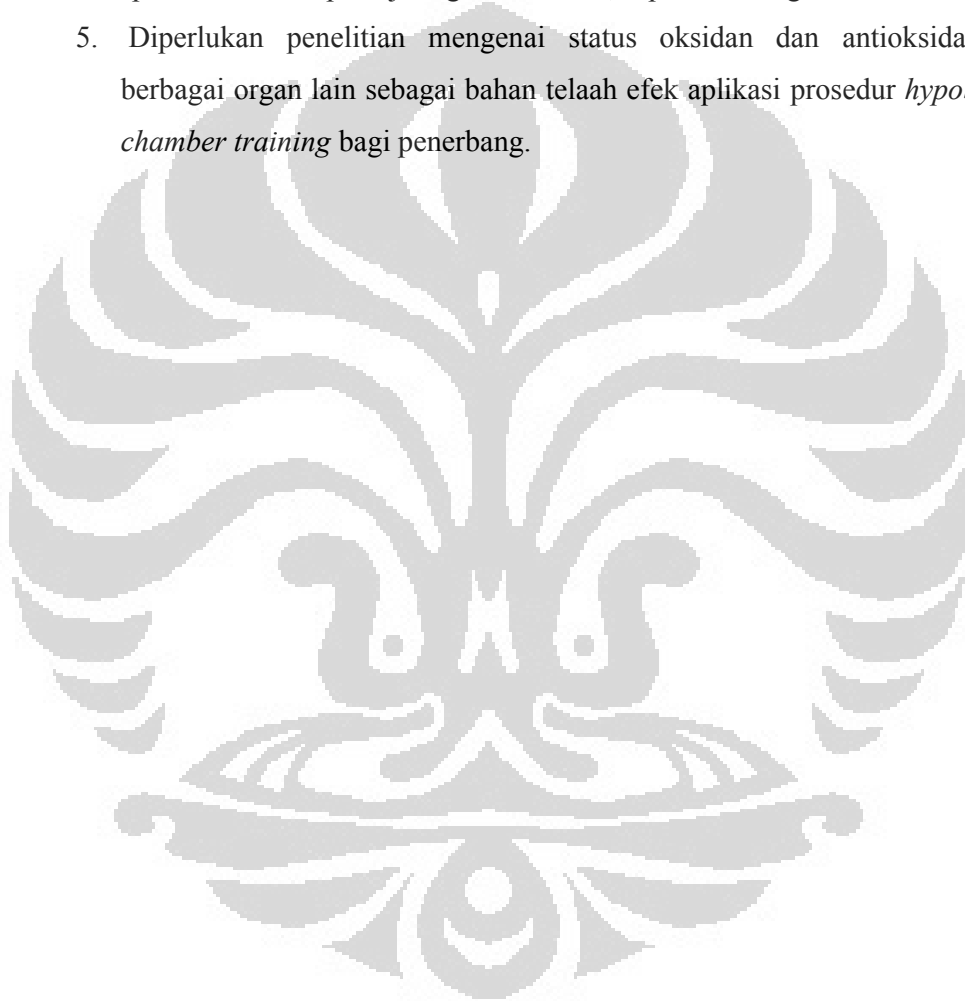
10. Terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 2 (dua) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi 4 (empat) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
11. Tidak terdapat perbedaan aktivitas spesifik katalase yang signifikan antara kelompok yang diberi 3 (tiga) kali perlakuan hipoksia hipobarik dengan kelompok yang diberi 4 (empat) kali perlakuan hipoksia hipobarik.
12. Pada penelitian dengan sampel jaringan ginjal, dengan menggunakan prosedur perlakuan sumber sampel individu hewan yang sama, didapatkan hasil berlawanan dengan hasil penelitian ini. Hipoksia menyebabkan peningkatan aktivitas spesifik katalase pada jaringan ginjal.
13. Pada penelitian dengan sampel jaringan ginjal, dengan menggunakan prosedur perlakuan sumber sampel individu hewan yang sama, didapatkan hasil berlawanan dengan hasil penelitian ini. Hipoksia menyebabkan peningkatan aktivitas spesifik katalase pada jaringan jantung.

6.2. Saran

Dari hasil penelitian ini masih diperlukan hal-hal sebagai berikut:

1. Diperlukan penelitian mengenai status oksidan dan antioksidan total pada sampel hati tikus pada penelitian ini untuk mengetahui efek hipoksia hipobarik terhadap status oksidatif jaringan hati.
2. Diperlukan penelitian mengenai status oksidan spesifik pada sampel hati tikus pada penelitian ini untuk mengetahui adanya faktor lain yang menyebabkan penurunan aktivitas spesifik katalase. Komponen sistem oksidan spesifik yang perlu diukur di antaranya:
 - peroksidasi lipid melalui pengukuran produk antara, malondialdehid
 - aktivitas spesifik enzim-enzim yang menggunakan substrat oksigen seperti oksidase (misal: xantin oksidase) dan oksigenase (misal: sitokrom P450).
3. Diperlukan penelitian mengenai status antioksidan spesifik pada sampel hati tikus pada penelitian ini untuk mengetahui adanya faktor lain yang berperan menyebabkan penurunan aktivitas spesifik katalase. Komponen sistem antioksidan spesifik yang perlu diukur di antaranya:

- aktivitas spesifik enzim antioksidan lain seperti superoksida dismutase dan glutathion peroksidase
 - aktivitas vitamin antioksidan seperti β karoten (vitamin A) yang banyak tersimpan di hati, vitamin E, dan vitamin C.
4. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor lain di luar sistem oksidan-antioksidan yang berperan dalam penurunan aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus, seperti autofagia.
 5. Diperlukan penelitian mengenai status oksidan dan antioksidan di berbagai organ lain sebagai bahan telaah efek aplikasi prosedur *hypobaric chamber training* bagi penerbang.



DAFTAR REFERENSI

1. Harris MD, Terrio J, Miser WF, Yetter JF. High-altitude medicine. *American Family Physician* 1998; 57(8). Available from: www.aafp.org/afp/980415ap/harris.html /May 2009.
2. Harding RM. Pressure changes and hypoxia in aviation. In: Pandoff KB, Burr RE, editors. *Medical aspects of harsh environments*. 3rd ed. USA: Office of The Surgeon General, Dept. Of The Army; 2002. p. 985-94. Available from: www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/harshEnv2/HE2ch32.pdf /May 2009.
3. Nunneley SA. Introduction to special environments. In: USA: Office of The Surgeon General, Dept. Of The Army; 2002. p. 871-9. Available from: www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/harshEnv2/HE2ch28.pdf /May 2009.
4. Tansey EA. Teaching the physiology of adaptation to hypoxic stress with the aid of a classic paper on high altitude by Houston and Riley. *Advan. Physiol. Edu.* 2008;32:11-17. Available from: www.advan.physiology.org/cgi/content/full/32/1/11/F1 /June 2009.
5. Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP. An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *PNAS* 2002; 99(26):17215-88. Available from: www.pnas.org/content/99/26/17215.abstract /May 2009.
6. Effect of Aircraft-cabin Altitude on Passenger Discomfort. www.content.nejm.org/cgi/reprint/357/1/18.pdf /June 2009.
7. Nehrenz GM : altitude and oxygenation . *The Internet Journal of Aeromedical Transportation* 2000; 1(1). Available from: www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_aeromedical_transportation/volume_1_number_1_7/article/altitude_and_oxygenation.html /May 2009.

8. Joanny P, Steinberg J, Robach P, Gortan C, Gardette B, Jammes Y. Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise. *Resuscitation* 2001; 49(3):307-14. Available from: www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T19-43BXN1D-G&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=2f9b65ca50ce43a752ce9527f138eda4 /May 2009.
9. Paul AL, Ferl RJ. The biology of low atmospheric pressure—implications for exploration mission design and advanced life support. *Gravitational and Space Biology* 2006;19(2):3. Available from: www.gravitationalandspacebiology.org/index.php/journal/377 /May 2009.
10. Kumar V, Abbas AA, Fausto N, editors. *Robins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 11-24, 74-5.
11. Braunwald E. Hypoxia and cyanosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hanser S, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*, editors. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.p. 209-11.
12. Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP. An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *PNAS* 2002; 99(26):17215-88. Available from: www.pnas.org/content/99/26/17215.abstract /May 2009.
13. Moore LG. Human genetic adaptation to high altitude. *High Altitude Medicine & Biology* 2001;2(2). Available from: www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/152702901750265341 /May 2009.
14. Moore LG. Comparative human ventilatory adaptation to high altitude. *Respiration Physiology* 2000;121(2):257-76. Available from: www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T3J-410D1KV-

H& user=10& rdoc=1& fmt=& orig=search& sort=d&view=c& acct=C000050221& version=1& urlVersion=0& userid=10&md5=902e8b76a553b845e686471b931743da /May 2009.

15. Chen QH, Ge RL, Wang XZ, Chen HX, Wu TY, Kobayashi T, Yoshimura K. Exercise performance of Tibetan and Han adolescents at altitudes of 3,417 and 4,300 m. *J Appl Physiol* 1997;83:661-7. Available from: www.jap.physiology.org/cgi/reprint/83/2/661 /May 2009.
16. Magaliiies et. al. Oxidative stress in humans during and after 4 hours of hypoxia at s simulated altitude of 5500 m. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 2004;75(1):16-9. Available from: www.ingentaconnect.com/content/asma/ asem/2004/00000075/00000001 /May 2009.
17. Sarkar S, Banerjee PK, Selvamurthy W. High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003;8(1-2):287-305. Available from: www.ingentaconnect.com/search/article?title=liver+high+altitude&title_type=tka&year_from=1998&year_to=2009&database=1&pageSize=20&index=4 /May 2009.
18. Bakonyi T, Radak Z. High altitude & free radicals. *Journal of Sports Science and Medicine* 2004;(3):64-69. Available from: www.jssm.org/vol3/n2/6/v3s6pdf.pdf /May 2009.
19. Lam DM. Aviation Medicine. In: *Aviation Medicine*. Available from: Available from: www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/harshEnv2/HE2ch25.pdf /June 2009.
20. Costa LE. Hepatic cytochrome P-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *AJP - Cell Physiology* 1990;259:654-9. Available from: www.ajpcell.physiology.org/cgi/reprint/259/4/C654.pdf /May 2009.
21. Singh SN, et.al. Effect of high altitude (7,620□m) exposure on glutathione and related metabolism in rats. *European Journal of Applied Physiology* 2001;84(3). Available from:

- [www.biomedexperts.com/.../Effect of high altitude 7 620 m exposure on glutathione and related metabolism in rats](http://www.biomedexperts.com/.../Effect%20of%20high%20altitude%207%20620%20m%20exposure%20on%20glutathione%20and%20related%20metabolism%20in%20rats) /May 2009.
22. Nakanishi K, et.al. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol.* 1995;489(3): 869–76. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788950 /May 2009.
 23. Costa LE, Boveris A, Koch OR, Taquini AC. Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *AJP - Cell Physiology.* 1988;255 (1):123-9. Available from: www.ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/255/1/C123 /May 2009.
 24. Marks DB, Marks AD, Smith CS. Biokimia kedokteran dasar: sebuah pendekatan klinis. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1996. h. 321-33.
 25. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia Harper. Edisi 25. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2000. h. 122-3.
 26. Reiter. RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB Journal* 1995;9:526-33.
 27. Wu D, Cederbaum, A.I. Introduction—Serial review: Alcohol, oxidative stress, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine* 2001;31:1524–6. Available from: www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584901007432 /August 2008.
 28. Thomas JA. Oxidative stress including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress. Available from: www.jbc.org/cgi/reprint/M010120200v1.pdf /August 2008.
 29. Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights. Advanced Nutrition Publications* 1998; 31(1/96):1-4. Available from: /August 2008.
 30. Matta MS, Wilbraham AC, Staley DD. Introduction to general, organic, and biological chemistry. Lexington: D.C. Heath and Company; 1996. p. 166.
 31. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Atlas berwarna dan teks anatomi manusia, jilid 2: alat-alat dalam. Edisi 6. Jakarta: Penerbit Hipokrates; 1995. h. 243-7.

32. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 420-32.
33. Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems*. 5th ed. Belmont: Brooks/Cole; 2004. p. 618-20.
34. Guyton AC. *Textbook of medical physiology*. 8th ed. Philadelphia: W.W. Saunders Company; 1991. p. 282-3.
35. Crawford JM. Liver and biliary tract. In: Abbas VK, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 878-81.
36. Lemasters JJ, Stemkowski CJ, Ji S, Thurman RG. Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver. *The Journal of Cell Biology*. 1983; 97: 778-86.
37. In: McPhee SJ, Ganong WF, editors. *Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine*. 5th ed. New York: Lange Medical Book; 2006. p. 391-401.
38. Braunwald E. Hypoxia and cyanosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser S, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. McGraw-Hill: New York.; 2005. p. 209-11.
39. Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews* 2006;6:244-51. Available from: www.nature.com/nri/journal/v6/n3/fig_tab/nri1784_F1.html&usg=__kVWvg_8Abuogqtbual7gpILLpc0=&h=302&w=480&sz=35&hl=id&start=14&um=1&tbnid=YGhcHr9WqOwqzM:&tbnh=81&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Dliver%2Bacinus%26hl%3Did%26rlz%3D1T4ADBF_enID316ID317%26sa%3DN%26um%3D1 /June 2009.
40. Srivastava KK, Prakash O. Animal metabolism and nutritional requirements under physiological stress—effect of high altitude. *Suppl. Def. Sci. J* 1966;16:125-36. Available from: www.publications.drdo.gov.in/gsd/collect/defences/index/assoc/HASHa801.dir/doc.pdf /June 2009.

41. Hollander J, Gore M, Fiebiq R, Mazzeo R, Ohishi S Ohno H, et. al. Spaceflight and regulation of antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 1998;24(2):385-90. Available from: www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584997002785. /May 2009.
42. Mohanraj P, Merola AJ, Wright VP, Clanton TL. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *Journal of Applied Physiology* 1998;84:1960-6. Available from: www.jap.physiology.org/cgi/content/abstract/84/6/1960 /June 2009.
43. Khan, S. and O'Brien, P.,J. Modulating hypoxia-induced hepatocyte injury by affecting intracellular redox state. *Biochimica Biophysica Acta* 1995;1269:153-61. Available from: www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167488995001126 /June 2009.
44. Quan F, Korneluk RG, Tropak MG, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research* 1986;14(13):5321-35. Available from: www.nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/14/13/5321 /June 2009.
45. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J. Biol. Chem* 2007;282(33):24407-15. Available from: www.jbc.org/cgi/content/abstract/282/33/24407 June 2009.
46. Boon EM, Downs A, Marcey D. Catalase: H₂O₂ oxidoreductase 2001. Available from: www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/catalase/cat1.htm. June 2009.
47. Chem*2580. Enzyme assay, detection & kinetics. Available from: www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm258/lecture13.pdf /June 2009.
48. Innova Biosciences. Enzyme units, activity, and specific activity explained. Available from: www.innovabiosciences.com/technicalresources/guides/Innova_Guide_Enzyme_Units.pdf /June 2009.

49. Nelson D, Cox M. Lehninger principles of biochemistry, 3rd Edition. Worth Publishers, New York; 2000. p.257-64.
50. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & Dev.* 2007;21:2861-73. Available from: www.genesdev.org/cgi/content/full/21/22/2861 /June 2009.
51. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu ZH, Freundt E, et. al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *PNAS* March 2006;103(13):4952-7. Available from: www.pnas.org/content/103/13/4952.abstract /June 2009.
52. Kroemer G, editor. Scarnati F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death and Differentiation* 2009;16:12–20. Available from: www.nature.com/cdd/journal/v16/n1/full/cdd2008101a.html /June 2009
53. Lleo A, Invernizzi P, Selmi C, Coppel RL, Alpini G, Podda M, et.al. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *Journal of Autoimmunity* 2007;29(2-3):61-8. Available from: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WHC-4PCXXKS-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e3e29aa504ce30d4d9654843bbb84c43 /June 2009.
54. Velarde L, Whittembury J, Monge C. Oxidative phosphorylation of liver mitochondria from mice acclimatized to hypobaric hypoxia. *International Journal of Biometeorology* 1986;30(3):283-9. Available from: www.springerlink.com/index/F413H55NH3K38107.pdf. /June 2009 /June 2009.
55. Martin R, Fitzl G, Mozet C, Martin H, Welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys. Source: *Experimental Gerontology* 2002;37(12):1481-7. Available from: www.ingentaconnect.com/content/els/05315565/2002/00000037/00000012/art00168 /June 2009.

Lampiran 1: Hasil Analisa Gas Darah Arteri Tikus Percobaan

Hasil Analisa Gas Darah Arteri Tikus Percobaan

Tabel 1. Kelompok yang Diberi 1 (satu) Kali Perlakuan

| Tikus | Berat Badan (g) | pH | PCO ₂ (mmHg) | PO ₂ (mmHg) | Sat O ₂ (%) | [K] O ₂ (nmol/L) | Base Difference | BB | HCO ₃ ⁻ | tCO ₂ (mmol/L) |
|-------|-----------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------------------|---------------------------|
| E1 | 240 | 6.909 | 49.8 | 20.6 | 26.5 | 8.0 | -8.9 | 9.2 | 24.3 | 26.4 |
| E2 | 250 | 7.012 | 62.9 | 26.6 | 29.6 | 5.8 | -15.6 | 16.2 | 16.2 | 17.4 |
| E3 | 240 | 7.026 | 69.7 | 6.2 | 2.9 | 0.5 | -12.7 | -12.9 | 18.3 | 20.5 |
| E4 | 220 | 6.966 | 37.0 | 37.3 | 43.3 | 8.5 | -23.5 | -22.1 | 8.5 | 9.6 |
| E5 | 250 | 7.098 | 69.4 | 19.1 | 16.7 | 3.3 | -8.4 | -8.7 | 21.5 | 23.4 |
| E6 | 180 | 7.018 | 66.6 | 8.0 | 3.9 | 0.8 | -14.0 | -14.0 | 17.2 | 19.2 |
| E7 | 250 | 7.027 | 54.9 | 3.8 | 1.7 | 0.3 | -13.7 | -17.2 | 19.2 | 19.2 |

Tabel 2. Kelompok yang Diberi 2 (dua) Kali Perlakuan

| Tikus | Berat Badan (g) | pH | PCO ₂ (mmHg) | PO ₂ (mmHg) | Sat O ₂ (%) | [K] O ₂ (nmol/L) | Base Difference | BB | HCO ₃ ⁻ | tCO ₂ (mmol/L) |
|-------|-----------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------------------|---------------------------|
| F1 | 230 | 7.137 | 63.3 | 4.4 | 2.1 | 0.4 | -7.8 | -7.9 | 21.2 | 23.1 |
| F2 | 220 | 6.933 | 81.0 | 3.2 | 1.2 | 0.2 | -15.5 | -16.0 | 16.9 | 19.2 |
| F3 | 210 | 7.071 | 61.9 | 9.8 | 5.2 | 1.0 | -12.1 | -12.1 | 17.8 | 19.8 |
| F4 | 215 | 6.929 | 79.7 | 2.8 | 1.1 | 0.2 | -16.4 | -16.4 | 16.5 | 18.8 |
| F5 | 220 | 6.915 | 69.5 | 7.3 | 2.9 | 0.6 | -18.8 | -18.8 | 13.9 | 16.0 |
| F6 | 205 | 7.023 | 70.4 | 1.5 | 0.6 | 0.1 | -13.1 | -13.1 | 18.1 | 20.2 |
| F7 | 215 | 7.104 | 56.1 | 1.3 | 0.6 | 0.1 | -11.7 | -11.7 | 17.4 | 19.1 |

Lampiran 1: Hasil Analisa Gas Darah Arteri Tikus Percobaan (lanjutan)

Tabel 3. Kelompok yang Diberi 3 (tiga) Kali Perlakuan

| Tikus | Berat Badan (g) | pH | PCO ₂ (mmHg) | PO ₂ (mmHg) | Sat O ₂ (%) | [K] O ₂ (nmol/L) | Base Difference | BB | HCO ₃ ⁻ | tCO ₂ (mmol/L) |
|-------|-----------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|------|-------------------------------|---------------------------|
| G1 | 300 | 6.845 | 121.4 | 24.9 | 14.5 | 3.1 | -16.1 | 31.8 | 20.5 | 24.2 |
| G2 | 300 | 6.804 | 127.3 | 3.5 | 0.5 | 0.1 | -17.8 | 30.1 | 19.5 | 23.4 |
| G3 | 290 | 6.772 | 159.6 | -1.4 | 0.0 | 0 | -16.0 | 31.9 | 22.7 | 27.6 |
| G4 | 300 | 6.737 | 113.6 | -1.4 | 0.0 | 0 | -23.0 | 24.9 | 14.9 | 18.4 |
| G5 | 300 | 6.823 | 96.4 | 54.1 | 49.5 | 10.5 | -20.6 | 27.3 | 15.4 | 18.4 |
| G6 | 250 | 6.907 | 85.2 | 79.7 | 79.6 | 16.8 | -17.8 | 30.1 | 16.5 | 19.2 |
| G7 | 300 | 6.821 | 110.9 | -1.4 | 0.0 | 0 | -18.9 | 29.1 | 17.7 | 21.1 |

Tabel 4. Kelompok yang Diberi 4 (empat) Kali Perlakuan

| Tikus | Berat Badan (g) | pH | PCO ₂ (mmHg) | PO ₂ (mmHg) | Sat O ₂ (%) | [K] O ₂ (nmol/L) | Base Difference | BB | HCO ₃ ⁻ | tCO ₂ (mmol/L) |
|-------|-----------------|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------------------|---------------------------|
| H1 | 280 | 7.041 | 81.6 | 29.9 | 29.7 | 6.2 | -8.7 | -9.6 | 21.9 | 24.3 |
| H2 | 310 | 7.030 | 83.2 | 4.5 | 1.9 | 0.4 | -9.0 | -9.9 | 21.8 | 24.2 |
| H3 | 305 | 6.965 | 80.4 | 15.7 | 8.7 | 1.8 | -13.8 | -14.4 | 18.1 | 20.4 |
| H4 | 280 | 6.970 | 69.7 | 15.4 | 8.6 | 1.8 | -15.9 | -16.1 | 15.9 | 17.9 |
| H5 | 290 | 7.039 | 76.3 | 27.7 | 26.2 | 5.6 | -10.3 | -10.3 | 20.4 | 22.6 |
| H6 | 290 | 6.951 | 72.7 | 48.9 | 54.9 | 11.5 | -16.3 | -16.5 | 15.8 | 18.0 |
| H7 | 280 | 7.275 | 54.2 | 24.1 | 31.7 | 6.5 | -1.8 | -1.8 | 25.0 | 26.6 |
| H8 | 305 | 7.055 | 62.5 | 12.0 | 6.7 | 1.4 | -13.1 | -12.9 | 17.3 | 19.1 |