



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**R AYU ANATRIERA
0105001332**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

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

**R AYU ANATRIERA
0105001332**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
JAKARTA
JULI 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 : R. Ayu Anatriera

NPM : 0105001332

Tanda Tangan :

Tanggal : 3 Juli 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : R. Ayu Anatriera
NPM : 0105001332
Program Studi : Pendidikan Dokter
Judul Skripsi : Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Ginjal 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. dr. rer. Physiol Septelia Inawati Wanandi ()

Penguji : Dr. T. Mirawati Sudiro, Sp.MK, PhD ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 3 Juli 2009

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul "Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Ginjal Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang". Laporan penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana program studi kedokteran umum di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penelitian ini membahas mengenai aktivitas spesifik katalase pada jaringan ginjal tikus percobaan yang telah dibuat dalam keadaan hipoksia hipobarik akut secara berulang. Penelitian ini dilaksanakan mulai tahun 2008 dan baru dapat diselesaikan pada bulan Juni 2009 ini karena dalam pelaksanaannya, terdapat beberapa hambatan terutama dalam proses pengumpulan data.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

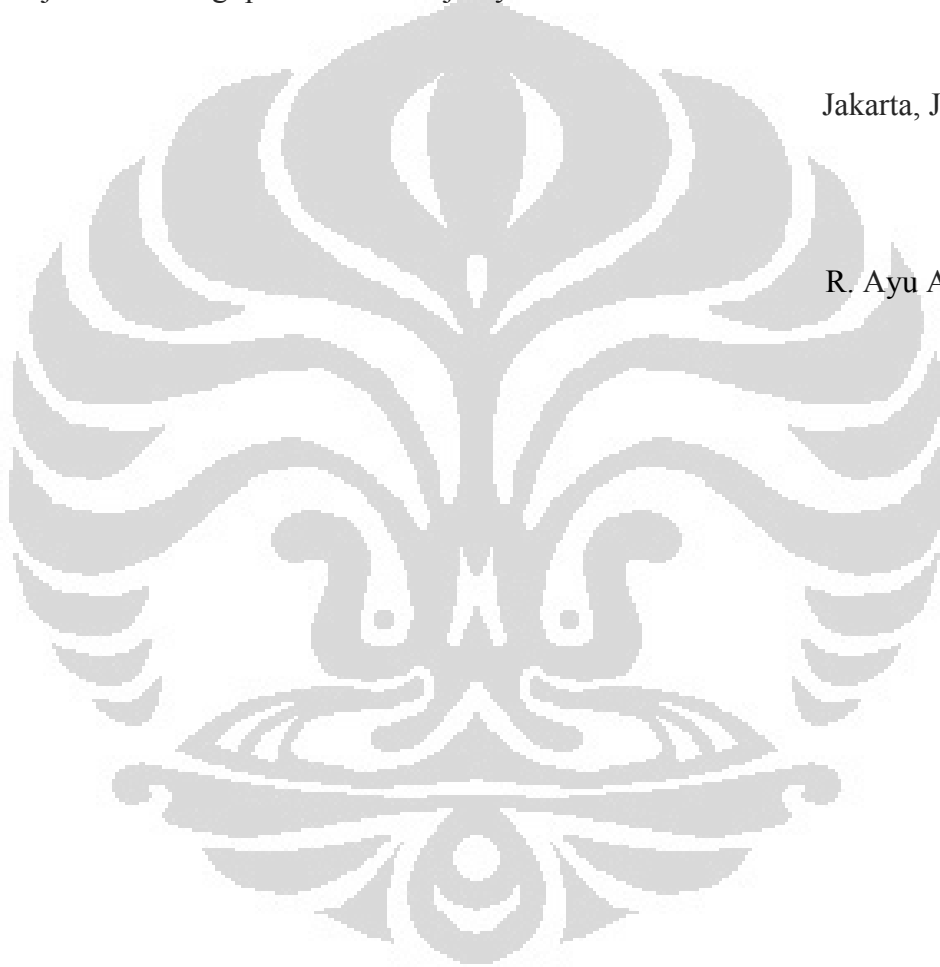
1. Dr. dr. rer. Physiol Septelia Inawati Wanandi, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Reni Paramita, selaku asisten dosen pembimbing yang telah membantu dan mengarahkan penulis dalam penyelesaian skripsi ini;
3. Dr. Wawan Mulyawan, selaku pemilik penelitian utama yang telah bersedia membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian skripsi ini;
4. Tim Modul Riset Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia periode 2008-2009 yang senantiasa memberi petunjuk dalam penyelesaian skripsi ini;
5. Departemen Ilmu Biokimia dan Kedokteran Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan;
6. Orang tua dan keluarga saya yang telah memberikan dukungan baik material maupun moral;

7. Hendra Kusuma, yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta memberikan motivasi kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini;
8. Widya Nugroho dan Silvia Febriyanti yang senantiasa memberikan motivasi dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini.

Saya menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, saya sangat mengharapkan masukan dan kritik yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat, dan menjadi acuan bagi penelitian selanjutnya.

Jakarta, Juli 2009

R. Ayu Anatriera



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : R. Ayu Anatriera
NPM : 0105001332
Program Studi : Pendidikan Dokter
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Skripsi

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

“Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Ginjal Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang”

Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, 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,

(R. Ayu Anatriera)

ABSTRAK

Nama : R. Ayu Anatriera
Program Studi : Pendidikan Dokter
Judul : Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Ginjal Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

Penelitian ini membahas aktivitas spesifik katalase dalam mencegah stres oksidatif pada jaringan yang disebabkan oleh kondisi hipoksia hipobarik. Hipoksia hipobarik akut berulang sering dialami oleh para penerbang, terutama ketika harus menjalani prosedur *Hypobaric Chamber training* yang rutin diadakan dua tahun sekali. Salah satu jaringan yang rentan terhadap stres oksidatif akibat hipoksia adalah jaringan ginjal. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut yang berulang. Desain penelitian yang digunakan adalah desain eksperimental. Sampel jaringan ginjal diambil dari total 25 ekor tikus jantan galur Wistar yang dikelompokkan menjadi empat kelompok perlakuan dengan perbedaan frekuensi terhadap perlakuan prosedur *Hypobaric chamber* dan satu kelompok kontrol. Metode untuk mengukur aktivitas spesifik katalase menggunakan metode Mates *et al.* (1999) yang telah dimodifikasi oleh Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan bermakna aktivitas spesifik katalase semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat perubahan berupa peningkatan yang signifikan aktivitas spesifik katalase di jaringan ginjal tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut secara berulang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata kunci : Aktivitas spesifik katalase, jaringan ginjal, hipoksia hipobarik akut berulang, tikus

ABSTRACT

Name : R. Ayu Anatriera
Study Programme : General Medicine
Title : Specific Activity of Catalase in Rats' Kidney
Induced by Acute Intermittent Hypobaric Hypoxia

This research determines about specific activity of catalase in preventing hypoxia-induced oxidative stress. Besides, one of the most common hypoxia condition which occurs in aviators is hypobaric hypoxia. Hypobaric chamber training which has been a fundamental component of aviation training could induce acute intermittent hypobaric hypoxia. Kidney was known as highly-demand organ of oxygen which makes its susceptible to oxidative injury. This research aims to determine changes in specific activity of catalase in rat's kidney exposed to acute intermittent hypobaric hypoxia. The research design used was experimental design. Twenty five male Wistar rats were divided into five groups of five animals each. One control group of rats were kept under normobaric oxygen atmosphere. Four experimental group were exposed to acute hypobaric hypoxia in a hypobaric chamber for some intermittent period of time. Specific activity of catalase was determined using Modified Mates method. The result shows that all experimental groups are significantly different in comparison with control group. This research concludes that there are significant increases in specific activity of catalase in all experimental groups compared to control group.

Keywords : Specific activity of catalase, acute intermittent hypobaric hypoxia, kidney, rats

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Hipotesis.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Hipoksia.....	6
2.1.1. Mekanisme.....	6
2.2. Hipoksia Hipobarik.....	6
2.2.1. Adaptasi Tubuh terhadap Ketinggian.....	8
2.2.2. Hipoksia Hipobarik dan Stres Oksidatif.....	10
2.3. Hipoksia Hipobarik pada Jaringan Ginjal.....	15
2.3.1. Fungsi Ginjal Normal.....	15
2.3.2. Sistem Vaskularisasi Ginjal.....	16
2.3.3. Perubahan Fisiologis Ginjal terhadap Ketinggian.....	18
2.3.4. Kondisi Hipoksia Hipobarik dan Stres Oksidatif di Jaringan Ginjal.....	19
2.4. Peran Katalase sebagai Antioksidan.....	21
2.4.1. Antioksidan dan Radikal Bebas.....	21
2.4.2. Mekanisme Kerja Antioksidan.....	23
2.4.3. Katalase.....	25
2.5. <i>Hypobaric Chamber Training</i>	28
2.6. Kerangka Konsep.....	34
3. METODE PENELITIAN.....	35
3.1. Desain Penelitian.....	35
3.2. Waktu dan Tempat.....	35
3.3. Sampel.....	35

3.4. Kriteria Eksklusi dan Inklusi.....	36
3.5. Besar Sampel.....	37
3.6. Prosedur Kerja.....	37
3.6.1. Identifikasi Variabel.....	37
3.6.2. Bahan dan Alat.....	37
3.6.3. Perlakuan Hipoksia Hipobarik.....	38
3.6.4. Pengambilan sampel.....	39
3.6.5. Pembuatan Pelarut.....	40
3.6.6. Pembuatan Homogenat.....	40
3.6.7. Optimasi Pengukuran.....	41
3.6.8. Penentuan Kadar Protein.....	42
3.6.9. Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase.....	43
3.7. Pengolahan dan Analisis Data.....	44
3.8. Pelaporan Data.....	44
3.9. Definisi Operasional.....	44
3.10. Alur Penelitian.....	45
4. HASIL.....	46
4.1. Hasil Optimasi Pengukuran.....	46
4.2. Penentuan Kadar Protein.....	50
4.3. Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase.....	51
4.4. Hasil Aktivitas Spesifik Katalase Sampel.....	53
5. PEMBAHASAN.....	54
5.1. Perubahan Aktivitas Spesifik Katalase di Jaringan Ginjal.....	56
5.2. Perbandingan Hasil Penelitian Serupa pada sampel Jaringan Hati dan Jantung.....	59
5.3. Kelebihan dan Kekurangan Penelitian.....	60
6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
6.1. Kesimpulan.....	61
6.2. Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Tahap-tahap Hipoksia	8
Tabel 4.1.	Penguraian H ₂ O ₂ oleh blanko dan sampel tiap satuan Waktu	47
Tabel 4.2.	Hasil selisih absorbansi blanko dan sampel	49
Tabel 4.3.	Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	50
Tabel 4.4.	Aktivitas spesifik katalase.....	54

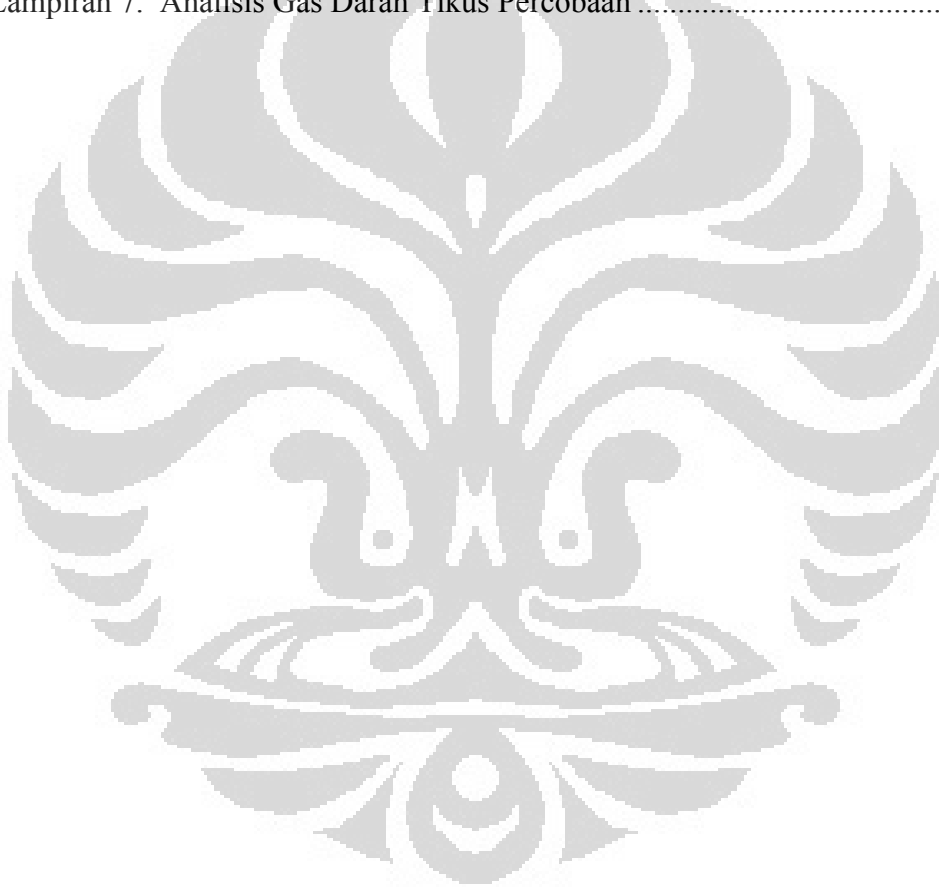


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tekanan udara menurun ketika ketinggian semakin Meningkat	8
Gambar 2.2.	Respon Inisial Inefisien.....	9
Gambar 2.3.	Proses Aklimatisasi	10
Gambar 2.4.	<i>Enhanced fitness level</i>	10
Gambar 2.5.	Mekanisme kerusakan akibat Ketinggian	11
Gambar 2.6.	Berbagai Kerusakan Akibat ROS	12
Gambar 2.7.	Skematik fungsi mitokondria	13
Gambar 2.8.	Bagan mekanisme cedera sel	14
Gambar 2.9.	Sistem vaskularisasi ginjal	16
Gambar 2.10.	Bagan Mekanisme cedera sel pada Ginjal	20
Gambar 2.11.	Pertahanan tubuh oleh Antioksidan	22
Gambar 2.12.	Langkah-langkah oksidasi lipid	23
Gambar 2.13.	Reaksi penghambatan antioksidan primer	24
Gambar 2.14.	Antioksidan bertindak sebagai prooksidan	24
Gambar 2.15.	Struktur Enzim Katalase	25
Gambar 2.16.	Mekanisme Katalitik Katalase	26
Gambar 2.17.	<i>Type A Chamber Flight Profile</i>	29
Gambar 2.18.	<i>Type B Chamber Flight Profile</i>	29
Gambar 2.19.	<i>Type C Chamber Flight Profile</i>	30
Gambar 2.20.	<i>Type I Chamber Flight Profile</i>	31
Gambar 2.21.	<i>Rapid Decompression Profile</i>	32
Gambar 2.22.	<i>Type II Chamber Profile</i>	32
Gambar 2.23.	<i>Type II Chamber Flight Profile</i>	33
Gambar 2.24.	Kerangka Konsep	34
Gambar 3.1.	Profil Penerbangan Pada Penelitian	39
Gambar 3.2.	Pembuatan Homogenat Jaringan.....	41
Gambar 3.3.	Bagan Alur Penelitian	45
Gambar 4.1.	Grafik Penguraian H ₂ O ₂	48
Gambar 4.2.	Grafik kecepatan penguraian H ₂ O ₂ oleh sampel tiap satuan waktu	48
Gambar 4.3.	Grafik penguraian H ₂ O ₂ pada menit ke-1 hingga menit ke-2.....	49
Gambar 4.4.	Grafik Kurva Standar Protein.....	51
Gambar 4.5.	Grafik Aktivitas spesifik katalase Ginjal	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Protokol <i>Hypobaric Chamber</i>	66
Lampiran 2. Data Serapan Aktivitas Spesifik Katalase	67
Lampiran 3. Uji Normalitas Distribusi Data	68
Lampiran 4. Uji <i>one-way</i> ANOVA	70
Lampiran 5. Jadwal Tahapan Penelitian	73
Lampiran 6. <i>Hypobaric Chamber</i>	75
Lampiran 7. Analisis Gas Darah Tikus Percobaan	76



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Manusia telah mengenal kehidupan di tempat tinggi sejak ribuan tahun lalu. Secara alami telah terjadi proses adaptasi fisiologis sebagai mekanisme kompensasi terhadap hipoksia karena berkurangnya jumlah molekul oksigen di udara. Proses adaptasi tersebut di antaranya peningkatan jumlah sel darah merah, peningkatan konsentrasi hemoglobin di darah vena, serta peningkatan saturasi oksigen di darah arteri.¹ Kemudian, setelah terciptanya pesawat terbang, manusia mulai mengenal kehidupan di ketinggian yang direkayasa (*engineered*). Hipoksia yang terjadi pada penerbangan, terutama pada penerbangan *unpressurized cabin* (kabin tanpa rekayasa tekanan udara) berbeda dari inhabitasi di tempat-tempat tinggi, di mana hipoksia bersifat akut, sehingga proses aklimatisasi belum sempat terjadi.

Pada tempat-tempat tinggi, juga terjadi penurunan tekanan atmosfer (hipobarik) yang berakibat pada menurunnya tekanan oksigen. Hipoksia hipobarik, suatu kondisi hipoksia yang secara praktik jarang dijumpai. Namun, kondisi ini sering ditemukan pada komunitas tertentu. Salah satu contoh proses hipoksia hipobarik ialah prosedur tertentu di dunia penerbangan dan penerjunan, khususnya militer udara.²

Pada tingkat sel, hipoksia mengakibatkan cedera sel melalui berbagai mekanisme, seperti depleksi energi yang berguna bagi metabolisme sel akibat penurunan fosforilasi oksidatif, gangguan fungsi enzim-enzim, kerusakan mitokondria, dan stres oksidatif yang menyebabkan gangguan fungsi pada tingkat organ.³ Stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan produksi dan eliminasi (*scavenging*) spesies oksigen reaktif (ROS).

Pembentukan *oxygen-derived free radicals* meningkat pada keadaan hipoksia.³ Berbagai radikal bebas seperti anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($\bullet OH$), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) dapat bereaksi dengan jaringan sel dan berhubungan dengan kerusakan (*injury*) jaringan dengan berbagai sebab. Studi pada sistem saraf pusat, gastrointestinal, ginjal, dan kardiovaskular menunjukkan

bahwa radikal bebas dan ROS berperan pada patofisiologi kerusakan jaringan.⁴ Pada keadaan hipobarik seperti saat terjadi pajanan lama pada ketinggian tertentu (*high altitude*), terjadi pula peningkatan stres oksidatif pada tubuh.⁵ Stres oksidatif adalah salah satu penyebab terpenting pada kerusakan bahkan kematian sel.

Antioksidan merupakan agen protektif yang menginaktivasi ROS serta secara signifikan menunda atau mencegah kerusakan oksidatif.⁶ Antioksidan dapat menghentikan radikal bebas dan melindungi sel dari stres oksidatif yang dapat mengakibatkan penuaan dan penyakit.⁷ Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa antioksidan dapat mengurangi resiko berbagai penyakit termasuk kanker dan penyakit kardiovaskuler.^{5,6}

Superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GSH-Px) dan katalase merupakan enzim antioksidan yang melindungi jaringan dari stres oksidatif. Superoksida dismutase mengkatalisis perubahan anion superoksida (O_2^-) menjadi H_2O_2 dan O_2 . GSH-Px dan katalase memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .^{1,3,5} Pada penelitian ini mempelajari efek hipoksia hipobarik pada aktivitas spesifik salah satu enzim antioksidan yaitu katalase pada tikus percobaan.

Di lain pihak, ginjal merupakan salah satu organ penting yang rentan terhadap perubahan oksigen.⁸ Dibandingkan dengan organ lain, kebutuhan oksigen pada ginjal relatif unik. Susunan paralel dari pembuluh darah arteri dan pembuluh balik vena meningkatkan difusi oksigen secara langsung melalui arteriol menuju sistem vena post-kapiler. Sistem unik dari kebutuhan dan konsumsi oksigen ini membuat jaringan ginjal menjadi rentan terhadap iskemik atau cedera hipoksia.⁹ Penggunaan oksigen yang tinggi pada ginjal disebabkan oleh transpor aktif dan reabsorpsi pada tubulointerstitial. Hipoksia pada ginjal tidak hanya membuat kerusakan pada tubulus namun juga berperan dalam pembentukan fibrosis interstitial di jaringan ginjal. Karena jaringan ginjal rentan terhadap cedera hipoksia, level enzim katalase termasuk tinggi di jaringan tersebut.¹⁰ Namun, penelitian mengenai aktivitas enzim antioksidan katalase pada jaringan ginjal masih belum banyak dipublikasikan, terutama ketika terpajan oleh kondisi hipoksia hipobarik akut yang berulang.

Penelitian ini menggunakan sampel tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut secara berulang. Perlakuan ini merupakan simulasi dari latihan

pembiasaan terhadap kondisi paparan hipoksia hipobarik (Indoktrinasi Latihan Aerofisiologi/ ILA) yang dilakukan terhadap penerbang atau penerjun militer Tentara Nasional Indonesia-Angkatan Udara (TNI-AU). Latihan adaptasi yang dilakukan terhadap personil militer tersebut dilakukan di Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa (Lakespra) Dr Saryanto dengan menggunakan alat simulasi, sebuah kamar hipobarik (*hypobaric chamber*), dan dikenal sebagai prosedur *hypobaric chamber training*. Prosedur ini biasanya dilakukan untuk peserta yang pertama kali dilatih (ILA awal) dan peserta ulangan (ILA penyegaran). Prosedur ini dilakukan dengan simulasi bertahap hingga ketinggian 35.000 kaki (kurang lebih 11 km) bahkan sampai 43.000 kaki, kemudian turun di ketinggian 25.000 kaki. Pada 25.000 kaki, kondisi ketinggian ini akan dipertahankan kurang lebih 5-10 menit, dan saat ketinggian ini didemonstrasikan oleh peserta sendiri terjadinya gejala-gejala hipoksia. Setelah itu secara bertahap akan kembali ke *sea level*. Awak pesawat harus mengikuti program penyegaran ini setiap dua tahun sekali.¹¹

Dasar ilmiah dari latihan hipoksia akut berulang pada *Hypobaric chamber training* hingga saat ini masih belum banyak dipublikasikan, terlebih terhadap paparan hipoksia hipobarik terhadap ginjal. Padahal telah diketahui terbentuknya radikal bebas sebagai efek negatifnya, merupakan salah satu kondisi yang dapat terjadi pada hipoksia di ketinggian.^{12,13}

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas spesifik katalase pada jaringan ginjal tikus percobaan yang mengalami hipoksia hipobarik akut berulang. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian utama dokter Wawan Mulyawan dari Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa (Lakespra) TNI Angkatan Udara yang sedang berjalan. Penelitian tersebut meneliti mengenai perubahan ekspresi gen HIF-1 alpha pada otak hewan percobaan setelah menjalani prosedur *Hypobaric chamber training* yang berulang.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut didapatkan rumusan masalah, yaitu:

- Apakah terdapat perubahan aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang?

1.3. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas didapatkan suatu hipotesis yaitu:

- Terdapat perubahan aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum Penelitian

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

1.4.2. Tujuan Khusus Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari dan mengamati perubahan aktivitas spesifik katalase dari jaringan ginjal tikus percobaan yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi kalangan medis

1. Menambah pengetahuan di bidang kedokteran biokimia dan biologi molekuler mengenai aktivitas spesifik katalase di jaringan ginjal tikus yang diinduksi keadaan hipoksia hipobarik akut berulang;
2. Sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya yang mengkaji dampak kondisi hipoksia hipobarik akut berulang terhadap kesehatan tubuh.

1.5.2. Bagi penulis

1. Meningkatkan kemampuan penulis dalam memahami langkah-langkah penelitian yang meliputi pembuatan proposal, proses penelitian, dan pembuatan laporan penelitian;
2. Menambah pengetahuan mengenai gambaran aktivitas spesifik katalase dari jaringan ginjal tikus percobaan hipoksia hipobarik akut berulang.
3. Memperoleh pengalaman belajar dan pengetahuan dalam mengelola penelitian.
4. Mengembangkan daya nalar dan semangat keingintahuan.
5. Menerapkan ilmu-ilmu yang diperoleh dari perkuliahan.

1.5.3. Bagi perguruan tinggi

1. Pengamalan tridarma perguruan tinggi sebagai lembaga penyelenggara pendidikan, penelitian dan pengabdian bagi masyarakat;
2. Sebagai sumbangan dalam mengkaji ilmu yang berkaitan dengan hipoksia hipobarik dan stres oksidatif untuk kegiatan akademis dan penelitian selanjutnya;
3. Meningkatkan hubungan kerjasama dan saling pengertian antara pendidik dan mahasiswa;
4. Meningkatkan kualitas penelitian perguruan tinggi dalam rangka menyukseskan pencapaian visi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) terkemuka 2010.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan di mana terjadi defisiensi oksigen, yang mengakibatkan kerusakan sel akibat penurunan respirasi oksidatif aerob sel. Hipoksia merupakan penyebab penting dan umum dari cedera dan kematian sel. Tergantung pada beratnya hipoksia, sel dapat mengalami adaptasi, cedera, atau kematian.⁶

2.1.1. Mekanisme

Hipoksia dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, di antaranya:¹⁴

- Hipoksia anemik
- Intoksikasi karbon monoksida (CO)
- Hipoksia respiratorik
- Hipoksia sekunder akibat ketinggian
- Hipoksia sekunder akibat piraau kanan ke kiri (*right-to-left shunting*) ekstrapulmoner
- Hipoksia sirkulatoris
- Hipoksia yang spesifik organ
- Peningkatan kebutuhan O₂
- Penggunaan (utilisasi) O₂ yang tidak adekuat

2.2. Hipoksia Hipobarik (*High Altitude*)

Manusia ataupun binatang di darat telah mengenal kehidupan pada kondisi lingkungan di ketinggian (*high altitude*) sejak ribuan tahun lalu, mengingat telah banyak kelompok masyarakat sejak jaman prasejarah yang hidup di pegunungan tinggi seperti di Tibet, Andes, dan Afrika Timur. Telah diketahui pula secara alami terjadi proses adaptasi fisiologis terhadap kondisi lingkungan seperti itu. Di mana adaptasi ini adalah konsekuensi terjadinya hipoksia karena pengurangan jumlah molekul oksigen yang bisa dihirup pada waktu bernapas.

Namun manusia baru mengenal kehidupan di ketinggian yang direkayasa (*engineered*) setelah mampunya dibuat pesawat terbang pertama kalinya dengan ketinggian jelajah di atas 10.000 kaki, terutama pesawat militer untuk peperangan.

Pada manusia yang mencapai ketinggian lebih dari 3.000 meter (10.000 kaki) dalam waktu singkat, tekanan oksigen intra-alveolar (PO_2) dengan cepat turun hingga 60 mmHg, dan gangguan memori serta gangguan fungsi serebri mulai bermanifestasi. Pada ketinggian yang lebih, saturasi oksigen arteri (Sat O_2) menurun dengan cepat, dan pada ketinggian 5.000 meter (15.000 kaki), individu yang tidak teraklimatisasi pada umumnya tidak dapat berfungsi dengan normal.¹⁵

Resiko klinis hipoksia akut pada ketinggian di atas 10.000 kaki juga kemudian diketahui, terutama pada penerbangan *unpressured cabin* (kabin tanpa rekayasa tekanan udara). Kondisi-kondisi tersebut di antaranya (pada yang ringan): penurunan kemampuan terhadap adaptasi gelap, peningkatan frekuensi pernapasan (hiperventilasi), peningkatan denyut jantung, tekanan sistolik, dan curah jantung (*cardiac output*). Sedangkan jika berlanjut terus akan terjadi gangguan yang lebih berat seperti berkurangnya pandangan sentral dan perifer, termasuk ketajaman penglihatan (*visus*), indera peraba berkurang fungsinya, dan pendengaran berkurang.

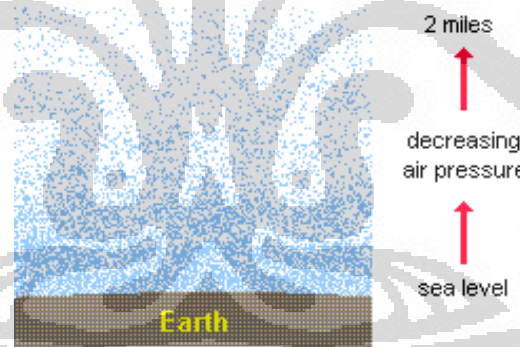
Demikian juga terjadi perubahan proses-proses mental seperti gangguan intelektual dan munculnya tingkah laku aneh seperti euforia (rasa senang berlebihan). Selain itu kemampuan koordinasi psikomotor akan berkurang. Pada tahapan yang kritis, setelah terjadinya sianosis dan sindroma hiperventilasi berat, maka tingkat kesadaran akan berangsur hilang (*loss of consciousness*), dan pada tahap akhir dapat terjadi kejang dilanjutkan dengan henti napas/*apnoe*. Secara umum, dapat dilihat dalam tabel di bawah ini:

Tahap	Ketinggian		Saturasi O ₂ (%)
	Menghirup Udara Biasa (21%)	Dengan O ₂ murni (100%)	
<i>Indifferent</i>	0 s.d. 10.000	34.000 s.d. 39.000	95 s.d. 90
Kompensasi	10.000 s.d. 15.000	39.000 s.d. 42.500	90 s.d. 80
<i>Disturbance</i>	15.000 s.d. 20.000	42.500 s.d. 44.800	80 s.d. 70
Kritis	20.000 s.d. 23.000	44.800 s.d. 45.500	70 s.d. 60

Tabel 2.1. Tahap-tahap Hipoksia.

2.2.1. Adaptasi Tubuh terhadap Ketinggian¹⁶

Terdapat dua macam penyebab stres lingkungan di ketinggian untuk manusia. Pertama, adanya perubahan iklim yang cukup ekstrim dari siang (panas sekali) ke malam hari (dingin). Angin juga bertiup kencang dengan kelembaban yang rendah, berdampak pada dehidrasi yang cepat. Kedua, tekanan udara yang rendah yang menjadi faktor keterbatasan signifikan dalam daerah ketinggian.



Gambar 2.1. Tekanan udara menurun ketika ketinggian semakin meningkat

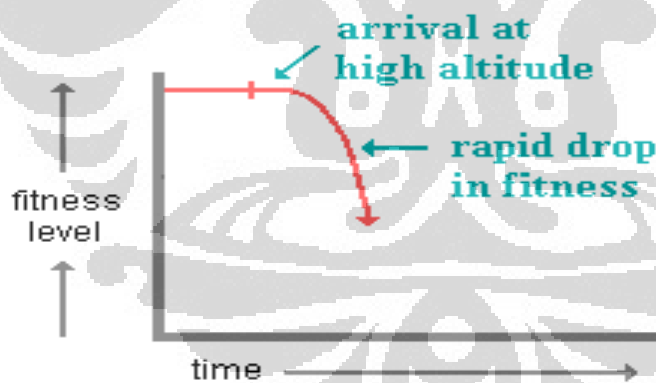
Persentase oksigen di udara pada ketinggian dua mil (3,2 km) sama seperti *sea level* (21%). Namun tekanan udara lebih rendah 30% pada ketinggian yang lebih jauh disebabkan molekul pada atmosfer yang lebih jarang sehingga letak molekul-molekul tersebut saling berjauhan.

Ketika kita menghirup udara pada *sea level*, tekanan atmosfer sekitar 1,04 kg per cm² yang menyebabkan oksigen dengan mudah melewati membran permeabel selektif paru menuju darah. Pada ketinggian, tekanan udara yang lebih

rendah membuat oksigen sulit untuk memasuki sistem vaskular tubuh. Hasilnya berdampak pada timbulnya hipoksia, atau kekurangan oksigen. Gejala awal hipoksia berupa ketidakmampuan melakukan aktivitas normal seperti menaiki tangga pendek tanpa disertai rasa lelah. Selain itu, gejala yang dapat timbul meliputi berkurangnya nafsu makan, pandangan yang kabur, kesulitan mengingat dan berpikir jernih.

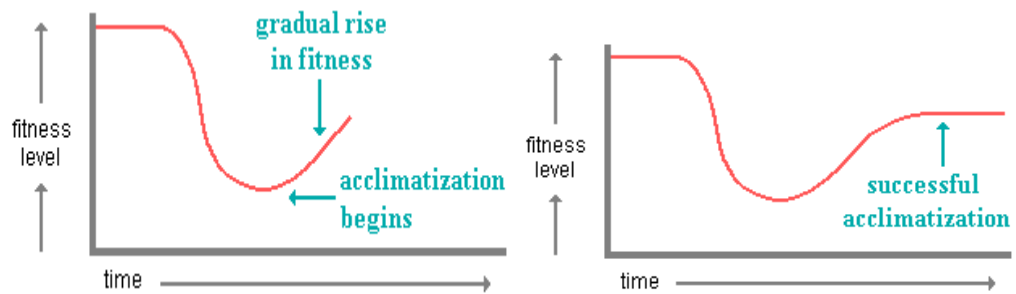
Pada kasus yang lebih berat, terjadi gejala edema pulmoner (*pneumonia-like symptoms*) dan akumulasi abnormal cairan di sekitar otak (*cerebral edema*) yang dapat berakibat pada kematian dalam beberapa hari jika tidak dikembalikan ke tekanan udara yang normal. Resiko untuk gagal jantung juga meningkat disebabkan stres yang terjadi pada paru-paru, jantung, dan pembuluh darah arteri di ketinggian.

Ketika kita bepergian ke daerah yang tinggi, tubuh kita mulai membentuk respon fisiologis yang inefisien. Terdapat kenaikan frekuensi pernapasan dan denyut jantung hingga dua kali lipat walaupun saat istirahat. Denyut nadi dan tekanan darah meningkat karena jantung memompa lebih kuat untuk mendapatkan lebih banyak oksigen.



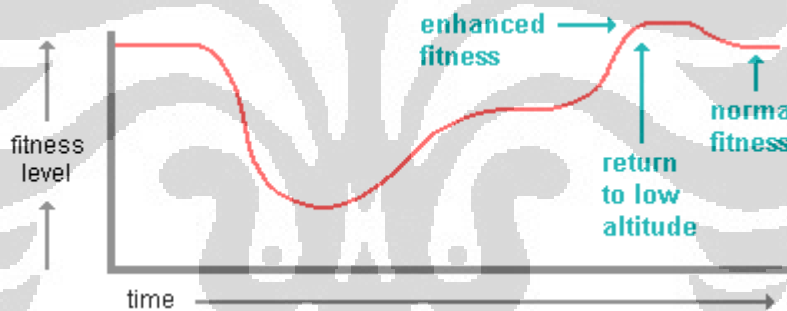
Gambar 2.2. Respon inisial inefisien terhadap paparan tekanan oksigen rendah

Kemudian, tubuh mulai membentuk respon efisien secara normal, yaitu aklimatisasi. Sel darah merah dan kapiler lebih banyak diproduksi untuk membawa oksigen lebih banyak. Paru-paru akan bertambah ukurannya untuk memfasilitasi osmosis oksigen dan karbondioksida. Terjadi pula peningkatan vaskularisasi otot yang memperkuat transfer gas.



Gambar 2.3. Proses aklimatisasi terhadap tekanan oksigen yang rendah

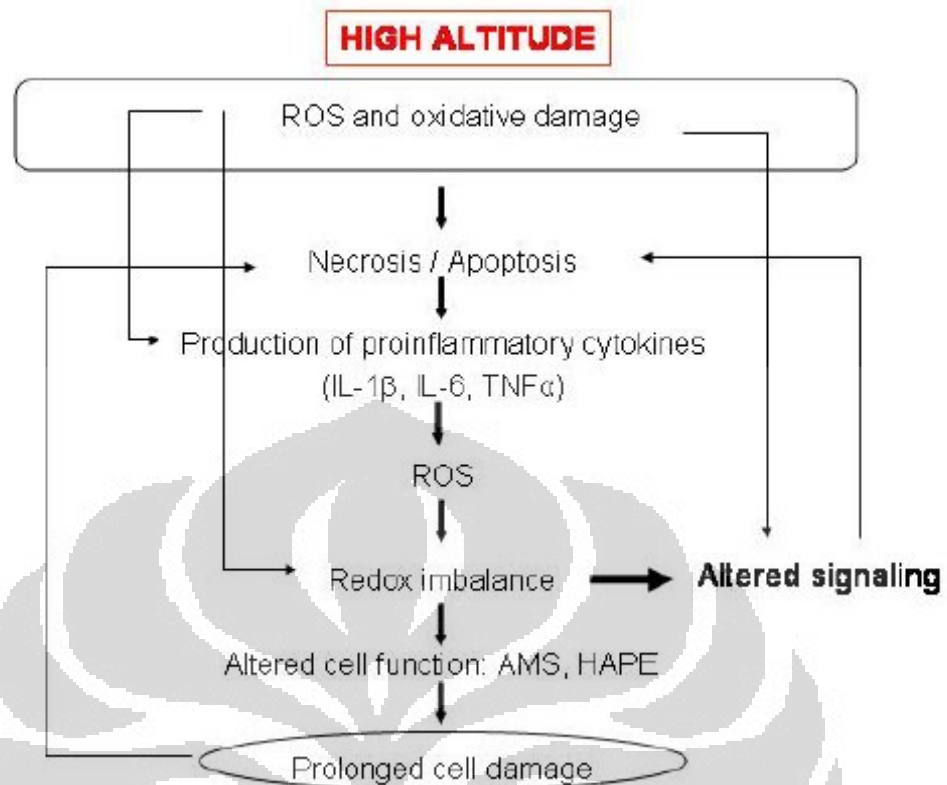
Ketika kembali pada level permukaan laut setelah terjadi aklimatisasi yang sukses terhadap ketinggian, tubuh akan mempunyai lebih banyak sel darah merah dan kapasitas paru yang lebih besar. Berdasarkan hal ini, Amerika dan beberapa negara sering melatih para atletnya di pegunungan. Akan tetapi, perubahan fisiologik ini hanya berlangsung singkat. Pada beberapa minggu, tubuh akan kembali pada kondisi normal.



Gambar 2.4. Kondisi tubuh yang menguat untuk waktu singkat setelah kembali dari ketinggian.

2.2.2. Hipoksia Hipobarik dan Stres Oksidatif

Pajanan terhadap ketinggian dapat menimbulkan penurunan tekanan oksigen dan peningkatan dari pembentukan spesies oksigen dan nitrogen reaktif yang dapat meningkatkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein, dan DNA.¹²

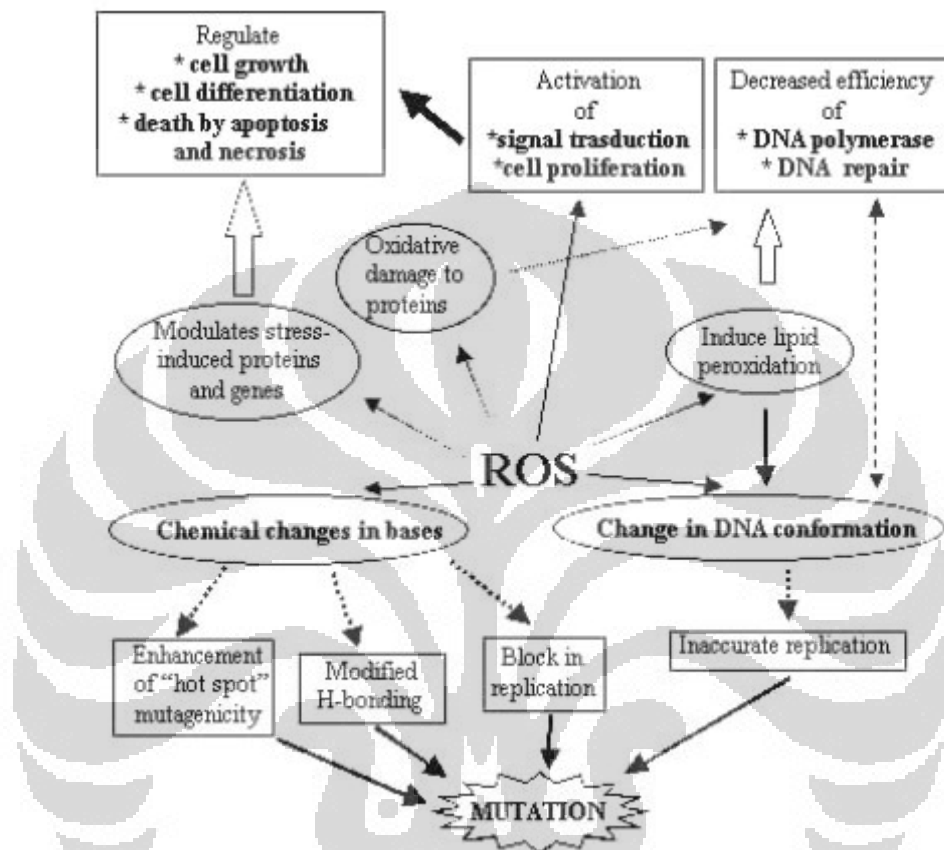


Gambar 2.5. Mekanisme kerusakan akibat ketinggian¹²

Radak et al. (1994) mengemukakan hasil penelitian tentang perubahan aktivitas enzim antioksidan dan kenaikan level peroksida lipid pada serat otot terhadap pajanan dua belas jam di ketinggian. Hasil serupa ditunjukkan pada studi manusia yang dilakukan oleh Moller et al (2001). Sebanyak dua belas sukarelawan dipajankan pada ketinggian 4.559 m, yang berakibat pada kerusakan DNA dan kenaikan peroksidasi lipid. Pada studi operasi Everest III, pada ketinggian 6.000 m kenaikan peroksidasi lipid sebanyak 23%, dan menjadi 79% pada ketinggian 8.848 m, menunjukkan kenaikan level kerusakan oksidatif sejalan dengan peningkatan ketinggian.¹²

Pada level seluler, hipoksia dapat mengakibatkan stres oksidatif pada sel. 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. Ketidakeimbangan antara proses pembentukan dan eliminasi (*scavenging*) radikal bebas berakibat pada stres oksidatif.

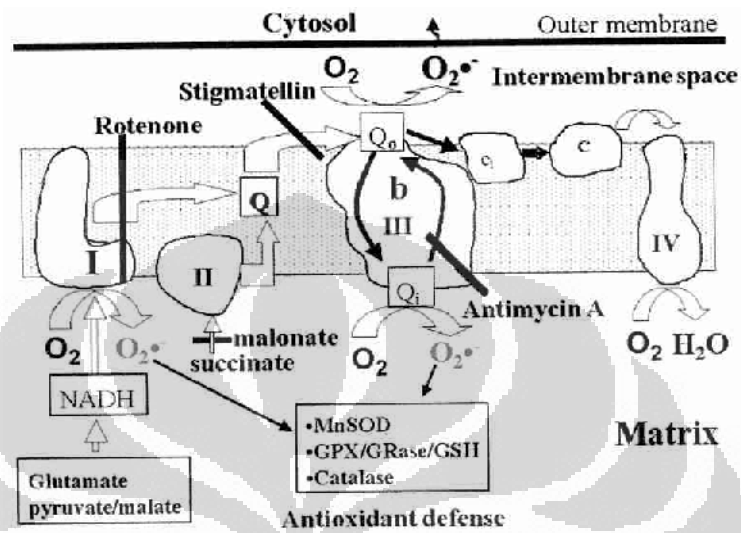


Gambar 2.6. Berbagai kerusakan akibat ROS¹²

Hipoksia menginduksi inflamasi melalui pelepasan mediator-mediator inflamasi oleh sel parenkim maupun endotel yang hipoksik.¹⁴ Neutrofil sebagai salah satu efektor inflamasi akut bekerja dengan membangkitkan radikal bebas.

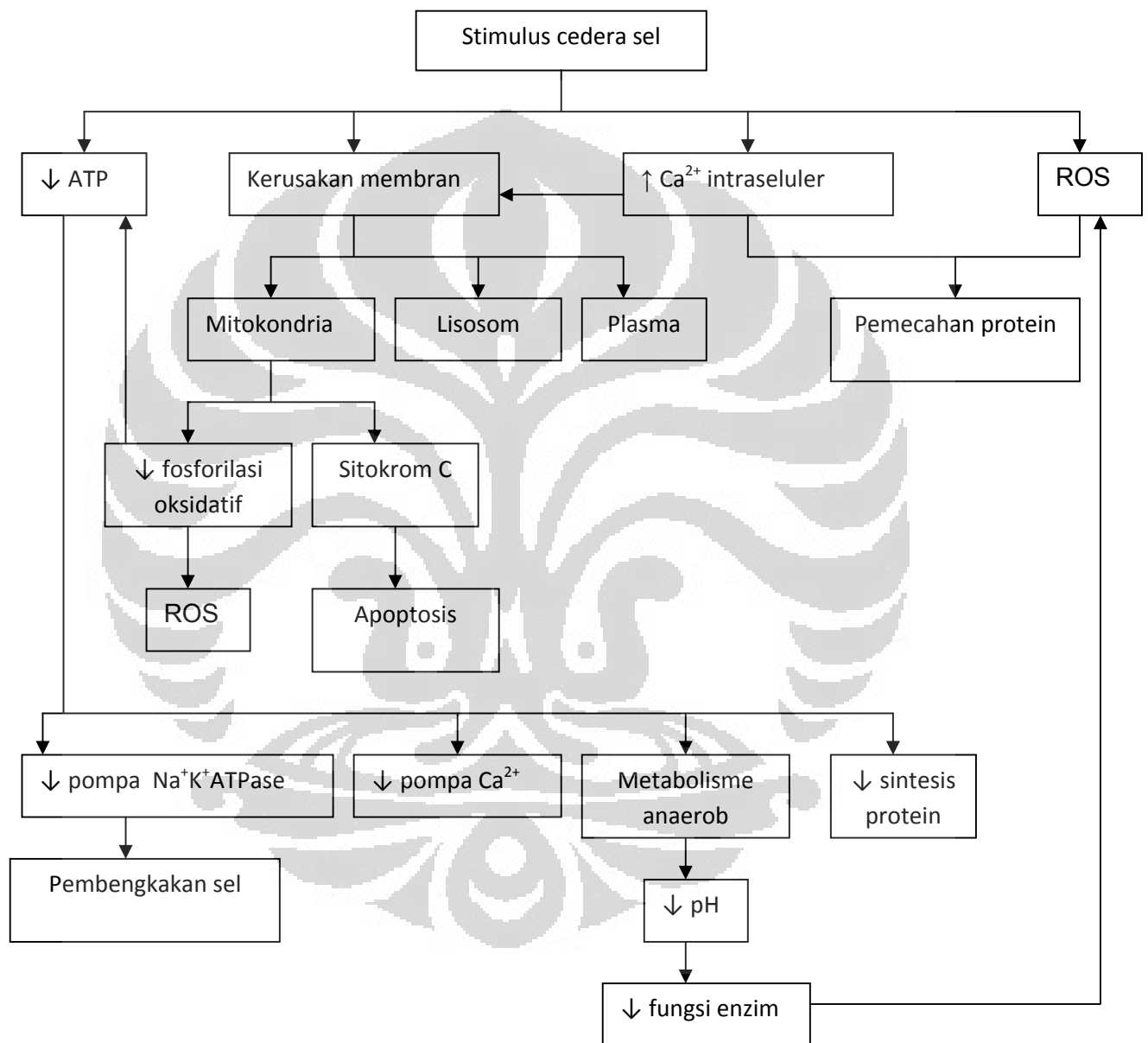
Mitokondria diduga merupakan tempat penghasil ROS yang utama pada kondisi hipoksia terutama karena adanya kebocoran elektron di kompleks III (Gambar 2.7). Pendapat lain menyatakan bahwa kondisi hipoksia tubuh merespon dengan peningkatan NO sebagai senyawa vasodilator. Nitrit oksida menghambat proses respirasi di mitokondria terutama di sitokrom oksidase (Kompleks IV) dengan berikatan pada situs yang sama dengan situs O₂. Pembentukan NO yang berlebihan akan menghambat proses di kompleks IV yang menggeser rantai

perpindahan elektron ke arah reduksi, kondisi yang akan meningkatkan pembentukan radikal superoksida pada kompleks I dan III.^{13,17}



Gambar 2.7. Gambar skematik fungsi mitokondria

Berikut di bawah ini adalah gambar bagan bagaimana kerusakan sel (salah satunya akibat hipoksia) dapat berdampak pada beberapa hal.



Gambar 2.8. Bagan mekanisme cedera sel.

2.3. Hipoksia Hipobarik pada Jaringan Ginjal

2.3.1. Fungsi Ginjal Normal

Ginjal berperan dalam homeostasis secara lebih ekstensif dibandingkan dengan organ-organ lain.¹⁸ Ginjal mengatur komposisi elektrolit, volume, dan pH lingkungan internal dan mengeliminasi semua zat sisa metabolisme tubuh, kecuali CO₂ yang dikeluarkan oleh sistem pernapasan. Ginjal melaksanakan fungsi pengaturan ini dengan mengeliminasi zat-zat yang tidak dibutuhkan oleh tubuh melalui urin. Berikut ini adalah cara-cara spesifik yang dilakukan ginjal untuk membantu homeostasis:¹⁸

Fungsi Regulasi

- Ginjal mengatur jumlah dan konsentrasi sebagian besar elektrolit cairan ekstra selular, termasuk elektrolit-elektrolit yang penting untuk mengatur eksitabilitas neuromuskulus.
- Ginjal berperan mempertahankan pH yang sesuai dengan mengeliminasi kelebihan H⁺ (asam) atau HCO₃⁻ (basa) dalam urin.
- Ginjal membantu mempertahankan volume plasma yang sesuai, yang penting untuk pengaturan jangka panjang tekanan darah arteri, dengan mengontrol keseimbangan garam dalam tubuh.
- Ginjal mempertahankan keseimbangan air dalam tubuh, yang penting untuk mempertahankan osmolaritas cairan ekstrasel yang sesuai.

Fungsi Ekskresi

- Ginjal mensekresikan produk-produk akhir metabolisme dalam urin. Zat sisa-sisa ini bersifat toksik bagi tubuh apabila tertimbun.
- Ginjal juga mensekresikan banyak senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh.

Fungsi Hormonal

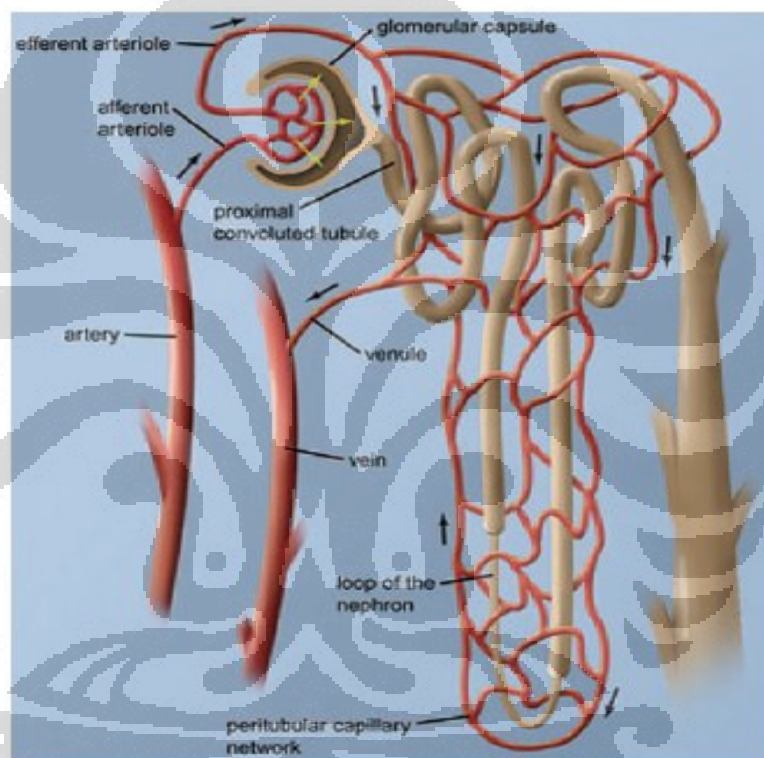
- Ginjal mensekresikan eritropoietin, hormon yang merangsang produksi sel darah merah oleh sumsum tulang. Fungsi ini berperan dalam homeostasis dengan membantu mempertahankan kandungan oksigen yang optimal di dalam darah.
- Ginjal juga mensekresikan renin, hormon yang mengawali jalur renin-

angiotensin-aldosteron untuk mengontrol reabsorpsi Na^+ oleh tubulus, yang penting dalam pemeliharaan jangka panjang volume plasma dan tekanan darah arteri.

Fungsi Metabolisme

- Ginjal membantu mengubah vitamin D menjadi bentuk aktifnya. Vitamin D penting untuk penyerapan Ca^{2+} dari saluran pencernaan.

2.3.2. Sistem Vaskularisasi Ginjal



Gambar 2.9. Sistem vaskularisasi di ginjal¹⁹

Pada manusia, arteri ginjal bercabang menjadi cabang anterior dan posterior sebelum memasuki parenkim. Cabang utama anterior bercabang menjadi empat segmen arteri yaitu segmen bagian apeks, segmen bagian atas dan segmen bagian tengah permukaan anterior dan segmen ke bagian bawah ginjal. Cabang utama posterior merupakan cabang yang memberikan darah ke daerah lainnya, terkadang ke bagian apeks.¹⁹

Semua segmen arteri ini adalah *end artery* yang berarti tidak ada anastomosis pada tiap-tiap cabang di bagian manapun. Obstruksi suatu arteri akan mengakibatkan iskemia pada seluruh distribusi yang dialirinya.

Percabangan arteri segmental adalah arteri interlobus yang menuju korteks melalui daerah di samping piramid medula. Arteri interlobus terbagi menjadi arteri arkuata yang kemudian bercabang dan membentuk arteri interlobular ke arah permukaan korteks. Arteriola aferen yang menuju glomerulus merupakan percabangan terkecil dari arteri interlobular.

Arteriola afferen kemudian bercabang menjadi kapiler glomerulus. Percabangan ini kemudian menyatu kembali di kutub vaskuler membentuk arteriola eferen. Arteriola eferen memasuki pleksus kapiler peritubular yang dikelilingi tubulus. Arteriola ini menyalurkan oksigen dan nutrien ke tubulus dan jaringan interstitial di sekitarnya.

Tekanan darah kapiler glomerulus telah diukur langsung pada tikus dan diperoleh nilai yang lebih rendah daripada yang diduga dari pengukuran tidak langsung.¹⁹ Bila tekanan darah arteri sistemik rata-rata 100 mmHg, maka tekanan darah di kapiler glomerulus sekitar 45 mmHg. Penurunan tekanan darah sepanjang kapiler glomerulus hanya 1-3 mmHg, namun didapat penurunan selanjutnya di arteriol eferen sehingga tekanan darah di kapiler peritubulus hanya sekitar 8 mmHg. Tekanan di vena renalis kira-kira 4 mmHg. Perbedaan tekanan seperti ini juga dijumpai pada monyet dan manusia, yaitu tekanan darah di kapiler glomerulus kira-kira 40% tekanan arteri sistemik. Epstein et al. (1994) melakukan pengukuran tekanan oksigen beberapa kali terhadap kedalaman yang berbeda-beda dari permukaan ginjal. Hasilnya terdapat perbedaan tekanan oksigen pada masing-masing kedalaman, semakin ke medula maka tekanannya semakin turun.²⁰ Tekanan oksigen dalam ginjal bervariasi disebabkan oleh struktur vaskularisasinya.

Untuk pengaturan arus darah di ginjal, angiotensin II dapat menimbulkan efek konstriksi yang lebih besar pada arteriol eferen daripada arteriol aferen. Golongan prostaglandin meningkatkan arus darah ke korteks ginjal dan menurunkan arus darah ke medula ginjal. Asetilkolin juga menimbulkan vasodilatasi pembuluh darah ginjal.

2.3.3. Perubahan Fisiologis Ginjal terhadap Ketinggian²¹

Perubahan fungsi ginjal pada ketinggian timbul sebagai efek langsung dari hipoksia sejalan dengan mekanisme kompensasi adaptasi lainnya, meliputi perubahan ventilasi pernapasan curah jantung, aktivitas saraf simpatis, dan eritropoiesis. Pengeluaran urin dan ekskresi sodium berhubungan dengan tekanan parsial oksigen (PO_2). Diuresis dan natriuresis disertai ekskresi bikarbonat dan kalium muncul sejalan dengan penurunan inspirasi oksigen yang akut dan dimediasi oleh kemoreseptor perifer sensitif oksigen.

Ketika respon ventilasi hipoksia dimediasi oleh kemoreseptor perifer, respon diuresis dan natriuresis hipoksia akut muncul selama 24-48 jam pertama bervariasi setiap individu. Pada hipoksia yang berat (fraksi oksigen $<0,1$), antidiuresis dan retensi sodium muncul sebagai hasil dari aktivasi saraf simpatik dan upregulasi angiotensin, aldosteron, dan vasopresin yang meningkat. Setelah terjadi aklimatisasi, individu akan mengalami kembali diuresis dan natriuresis di ketinggian yang lebih tinggi.

Hipoksia akut menyebabkan dua sampai tiga kali peningkatan ekskresi protein urin. Mekanisme pastinya masih belum jelas namun kemungkinan melibatkan perubahan permeabilitas kapiler, filtrasi glomerulus, atau reabsorpsi protein tubular. Dalam hal merespon PO_2 arteri yang rendah, sel kortikal interstitial meningkatkan produksi eritropoietin dengan menstimulasi *Hypoxia Inducible Factor-2* (HIF-2). Peningkatan hematokrit yang terjadi membantu oksigenasi ke jaringan. Eritropoietin dilepaskan sejak 1-2 jam setelah paparan hipoksia, dengan puncak pada 24-48 jam, dan menurun ke garis dasar setelah beberapa minggu sejalan dengan peningkatan hematokrit dan terjadi penekanan *feedback*. Ketika terpapar ketinggian yang lebih tinggi, maka terjadi produksi eritropoietin yang baru.

Mekanisme protektif selular yang berperan meliputi aktivasi faktor transkripsi induksi hipoksia (HIF-1 dan HIF-2), yang menstimulasi produksi eritropoietin, heme oksigenase, endothelial NO synthase—mediator produksi NO, enzim, faktor angiogenik, dan sebagainya yang meningkatkan oksigenasi jaringan. Mekanisme protektif ini berkaitan dengan pajanan hipoksia akut, namun tidak berkelanjutan pada pajanan hipoksia yang kronik, penuaan, yang dapat

mengakibatkan kerusakan mikrovaskular progresif sebagai hasil penurunan ekspresi *endothelial growth factor* dan molekul sitoprotektif lainnya.

2.3.4. Kondisi Hipoksia Hipobarik dan Stres Oksidatif di Jaringan Ginjal

Ginjal menerima aliran darah per unit masa, lebih tinggi dibandingkan organ tubuh yang lain. Fraksi oksigen yang diekstraksi oleh seluruh organ tubuh relatif lebih rendah bila dibandingkan dengan ginjal, namun ginjal sangat sensitif dengan keadaan hipoksia. Hal ini berhubungan dengan tingginya kadar konsumsi oksigen lokal oleh sel epitel tubulus dan vaskuler ginjal.⁸

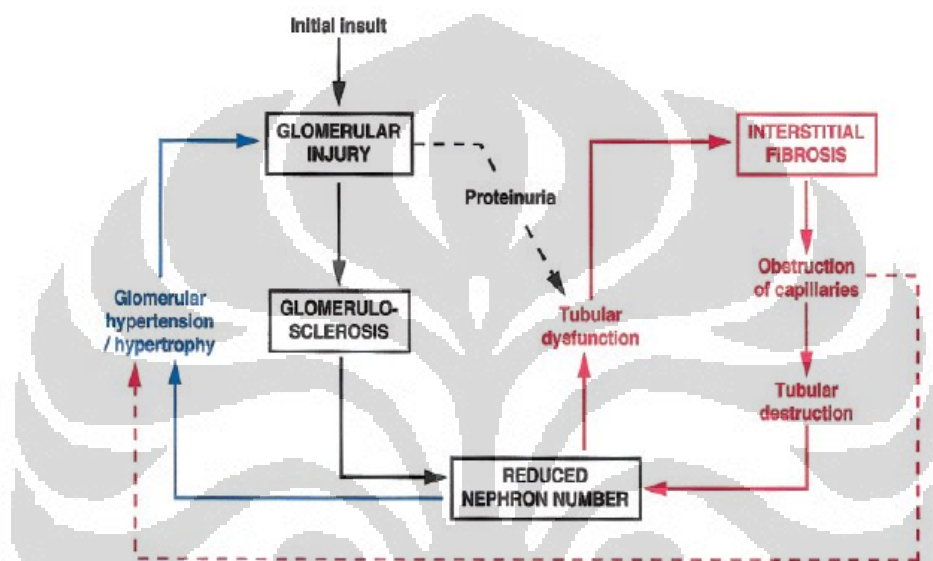
Ginjal merupakan organ tubuh dengan perfusi paling baik, bila dibandingkan dengan berat organ dan asupan oksigen permenit. Namun tekanan oksigen jaringan pada parenkim ginjal jauh lebih rendah dibandingkan organ lain dan tekanan terendah ada pada vena ginjal. Medula ginjal merupakan salah satu bagian tubuh dengan tekanan oksigen terendah. Perbedaan ini dijelaskan oleh adanya asupan oksigen yang tinggi dan tekanan oksigen jaringan yang rendah serta arsitektur unik vaskuler ginjal. Pada korteks dan medula ginjal, cabang cabang arteri dan vena ginjal berjalan secara paralel dan kontak erat antara satu dengan yang lain dalam jarak yang panjang. Hal ini memberikan kesempatan difusi oksigen dari sistem arteri menuju sistem vena sebelum masuk menuju kapiler. Mekanisme ini menjelaskan rendahnya tekanan oksigen di medula dan korteks ginjal.⁸

Segmen tubulus sebagian besar mempunyai kapasitas yang terbatas terhadap energi yang bersifat anaerobik sehingga tergantung pada oksigen dalam memelihara reabsorpsi aktif solut transtubulus. Penggunaan oksigen yang tinggi pada ginjal disebabkan oleh transpor aktif dan reabsorpsi pada tubulointerstitial.¹⁰

Kombinasi antara terbatasnya asupan oksigen jaringan dan tingginya kebutuhan oksigen merupakan faktor utama ginjal lebih mudah mengalami jejas iskemi akut. Oleh karena itu kerentanannya terhadap stres oksidatif, level enzim katalase yang cukup tinggi ditemukan pada ginjal. Pada ginjal, enzim katalase terutama ditemukan pada tubulus proksimal, Loop Henle, dan glomerulus.¹⁰

Kerusakan tubulointerstitial akibat hipoksia melalui mekanisme yang multifaktorial. Hipoksia dapat mengaktifasi fibroblas, perubahan metabolisme

matriks ekstrasel pada sel-sel ginjal, dan fibrogenesis. Aktivasi interstisial fibrosis akibat hipoksia dan peningkatan deposit matriks ekstrasel akan mengakibatkan gangguan aliran darah dan asupan oksigen. Sel tubulus ginjal yang mengalami hipoksia lebih mudah mengalami gangguan fungsi mitokondria dan defisit energi yang menetap. Hipoksia juga menginduksi apoptosis tubulus ginjal dan sel endotel melalui mekanisme mitokondria.^{8, 10}



Gambar 2.10. Bagan mekanisme cedera sel pada Ginjal

Sistem lain yang berperan di ginjal pada kondisi hipoksia yaitu sistem renin-angiotensin (RAS) dapat berperan dalam menginduksi pembentukan ROS melalui mediator enzim NADP(H) oksidase.⁸ Spesies oksigen reaktif yang meningkat akan mengakibatkan beberapa proses dalam sel seperti perubahan aktivitas enzim-enzim tirosin kinase dan fosfatase, mengaktifkan enzim-enzim protein kinase pengaktif proses mitosis dan menstimulasi faktor transkripsi. Spesies oksigen reaktif (ROS) juga secara langsung dapat mengubah aktivitas pompa-pompa ion dan selanjutnya, jika bergabung dengan NO akan menghasilkan peroksinitrit yang dapat menyebabkan kerusakan lebih lanjut. Semua proses ini mengakibatkan kerusakan ginjal akibat proses inflamasi dan mempercepat perkembangan fibrosis ginjal.

Pengurangan jumlah nefron akibat kerusakan tubulus dan fibrosis mengakibatkan peningkatan konsumsi oksigen oleh nefron-nefron yang tersisa, yang dapat berakibat pula pada peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS). Peningkatan produksi ROS ini dapat menyebabkan kerusakan tubulus dan pembentukan fibrosis interstitial lebih lanjut.¹⁰

2.4. Peran Katalase sebagai Antioksidan

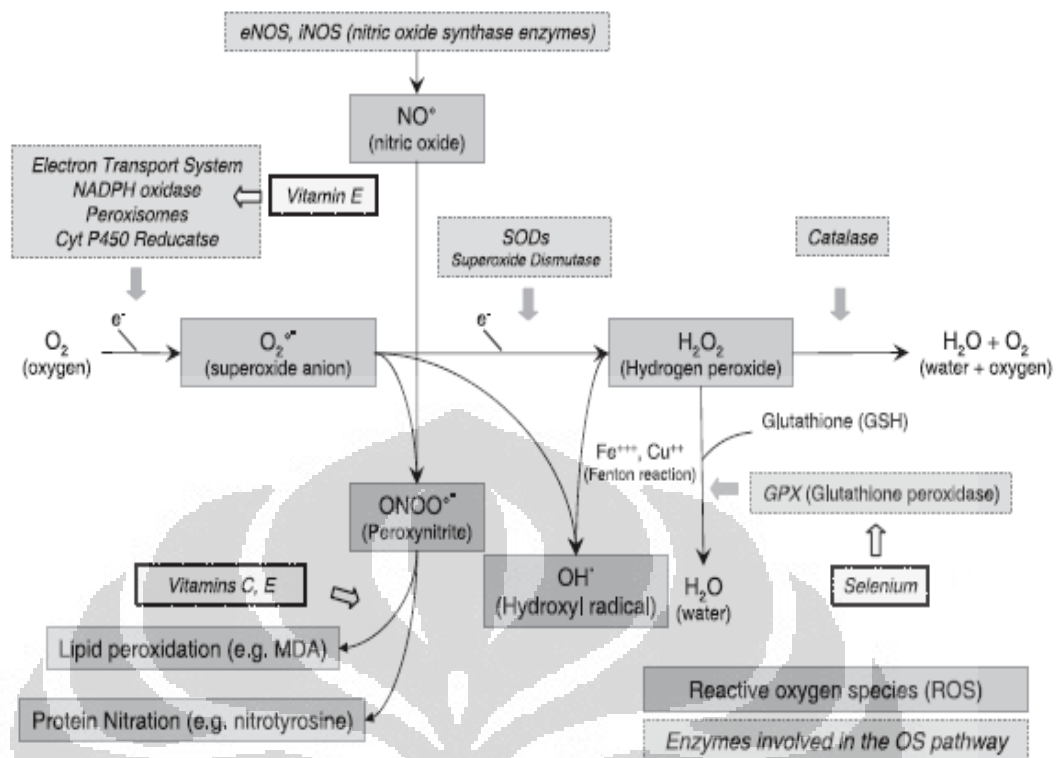
2.4.1. Antioksidan dan radikal bebas

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid.²²

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami).

Untuk memenuhi kebutuhan antioksidan, sebelumnya kita perlu mengenal penggolongan antioksidan itu sendiri. Antioksidan terbagi menjadi antioksidan enzim dan vitamin. Antioksidan enzim meliputi superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Antioksidan vitamin lebih populer sebagai antioksidan dibandingkan enzim. Antioksidan vitamin mencakup alfa tokoferol (vitamin E), beta karoten dan asam askorbat (vitamin C).

Superoksida dismutase berperan dalam melawan radikal bebas pada mitokondria, sitoplasma dan bakteri aerob dengan mengurangi bentuk radikal bebas superoksida. SOD murni berupa peptida orgoteina yang disebut agen anti peradangan. Kerja SOD akan semakin aktif dengan adanya poliferon yang diperoleh dari konsumsi teh. Enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen adalah katalase. Fungsinya menetralkan hidrogen peroksida beracun dan mencegah formasi gelembung CO₂ dalam darah.



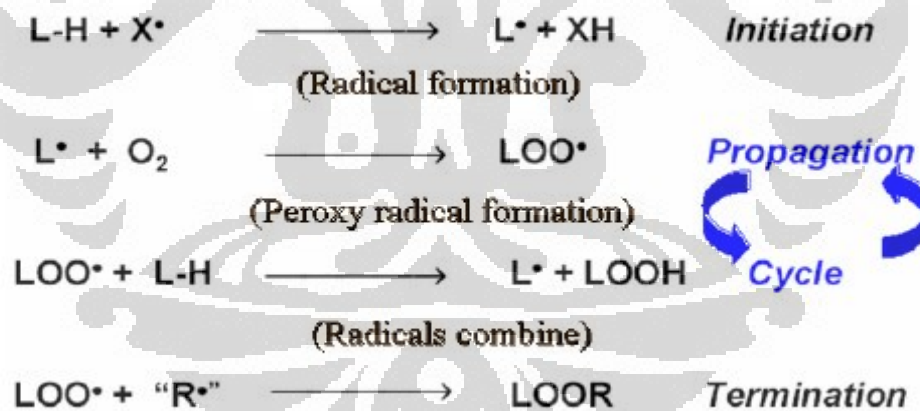
Gambar2.11. Pertahanan tubuh oleh antioksidan

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Radikal bebas memiliki reaktivitas tinggi karena bertindak sebagai penerima dan penarik elektron. Akibat reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal reaktif di dalam sel maupun jaringan tubuh. Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogen) dan luar tubuh (eksogen). Radikal bebas endogen di antaranya berasal dari proses tranpor elektron, reaksi enzimatik yang menggunakan oksigen, oksidasi hemoglobin, sedangkan radikal bebas eksogen antara lain berasal dari radiasi ultraviolet, obat, dan zat kimia.¹³

Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh merupakan derivat oksigen yang disebut sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). Tipe radikal bebas turunan oksigen reaktif sangat signifikan dalam tubuh. Oksigen reaktif ini mencakup superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil (ROO^{\cdot}), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (O_2), oksida nitrit (NO^{\cdot}), peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$) dan asam hipoklorit ($HOCl$).

Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi ROS ini adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid didefinisikan sebagai teroksidasinya senyawa lipid yang memiliki dua atau lebih ikatan rangkap (*polyunsaturated fatty acid/* PUFA). Rusaknya PUFA akan menyebabkan penurunan fluiditas membran yang akan berpengaruh pada fungsi membran terutama sebagai tempat difusi molekul antar sel ataupun intrasel. Proses peroksidasi lipid dapat dibagi menjadi beberapa tahap:²³

- Inisiasi, permulaan terbentuknya radikal bebas yang dipicu oleh suatu inisiator (X^{\bullet}) yang menarik sebuah hidrogen PUFA (L-H) membentuk suatu radikal lipid (L^{\bullet}).
- Propagasi, merupakan reaksi rantai radikal bebas yang menggunakan oksigen untuk membentuk radikal peroksi lipid (LOO^{\bullet}) dan peroksida lipid ($LOOH$).
- Terminasi, merupakan penghentian tahap propagasi yang disebabkan bergabungnya radikal-radikal bebas menjadi senyawa non-radikal.



Gambar 2.12. Langkah-langkah oksidasi lipid

2.4.2. Mekanisme Kerja Antioksidan²²

Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke

radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida.

Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil.

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.

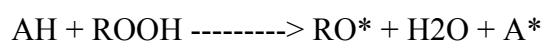
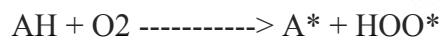


Radikal lipida



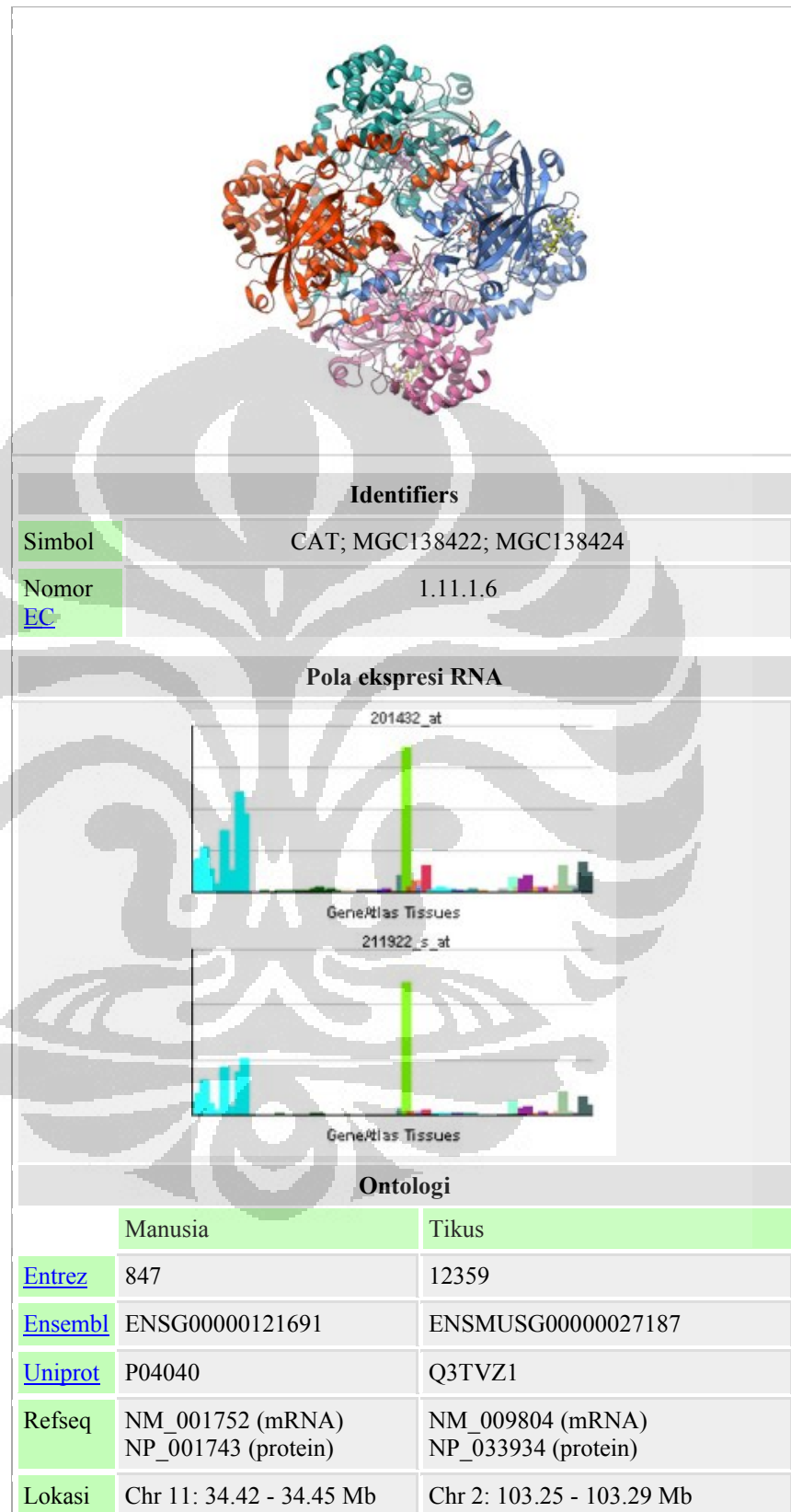
Gambar 2.13. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida.

Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Gambar 2.14). Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji.



Gambar 2.14. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi .

2.4.3. Katalase

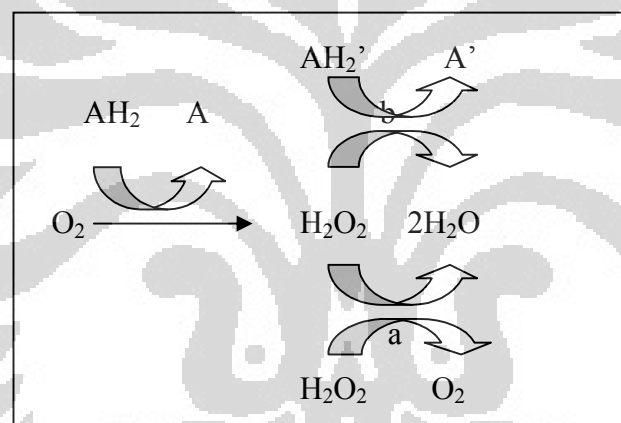


Gambar 2.15. Struktur enzim katalase

Katalase (CAT) merupakan suatu enzim yang terdiri dari empat subunit protein dengan berat molekul sekitar 240 kDa. Tiap subunitnya mengandung gugus hem (Fe(III)) yang terikat pada situs aktifnya. Selain itu tiap subunit biasanya juga mengandung satu molekul NADPH yang membantu menstabilkan enzim.

Enzim ini terutama terletak di dalam organel peroksisom. Katalase ditemukan di semua jaringan, dan aktivitasnya yang tinggi ditemukan di eritrosit, hati, ginjal, dan jaringan lemak. Katalase termasuk dalam kelas enzim oksido reduktase dengan nomor klasifikasi E.C.1.11.1.6.²³

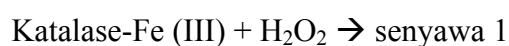
Katalase mampu mengkatalisis reaksi penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui dua mekanisme kerja yaitu katalitik dan peroksidatik.



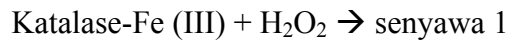
Gambar 2.16. Mekanisme katalitik dan peroksidatik katalase dalam menguraikan hidrogen peroksida.

Keterangan: AH_2 dan AH_2' : senyawa donor hidrogen
 A dan A' : senyawa hasil oksidasi
 a : mekanisme katalitik
 b : mekanisme peroksidatik

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. Mekanisme ini dapat digambarkan sebagai berikut:



Sedangkan mekanisme terjadi bila menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai akseptor elektron dan senyawa lain sebagai donor elektron. Senyawa yang dapat berperan sebagai donor elektron antara lain metanol, etanol, asam formiat, dan ion nitrit. Mekanisme ini dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan: AH_2 : senyawa donor hidrogen

A : senyawa hasil oksidasi

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.

2.5. Hypobaric Chamber Training

Untuk mengenal dan menyegarkan ingatan kembali terhadap kondisi yang dapat terjadi pada saat penerbang atau penerjun berada di ketinggian (pesawat tertentu bahkan dapat terbang hingga ketinggian lebih dari 60.000 kaki, dan penerjun HALO/ *High Altitude High Opening* dapat diterjunkan pada ketinggian 35.000 kaki), di TNI Angkatan Udara selalu diprogramkan pelatihan Indoktrinasi Latihan Aerofisiologi (ILA), dimana salah satunya berupa pengenalan kembali terhadap kondisi hipoksia hipobarik. Di lapangan, mereka telah dilengkapi dengan peralatan pelindung seperti *cabin pressurized* 5.000 kaki pada pesawat biasa yang terbang di atas 10.000 kaki dan tabung oksigen 100% pada penerjun yang diterjunkan di atas 10.000 kaki. Namun, mereka tetap harus senantiasa siap terhadap terjadinya kondisi darurat akibat alat-alat yang tidak berfungsi. Program *reminding* atau *refreshing in* ini harus dijalani rutin setiap dua tahun sekali dengan menggunakan alat simulasi yang dinamakan *Hypobaric chamber*.¹¹

Beberapa prosedur *hypobaric chamber training* yang dikenal:

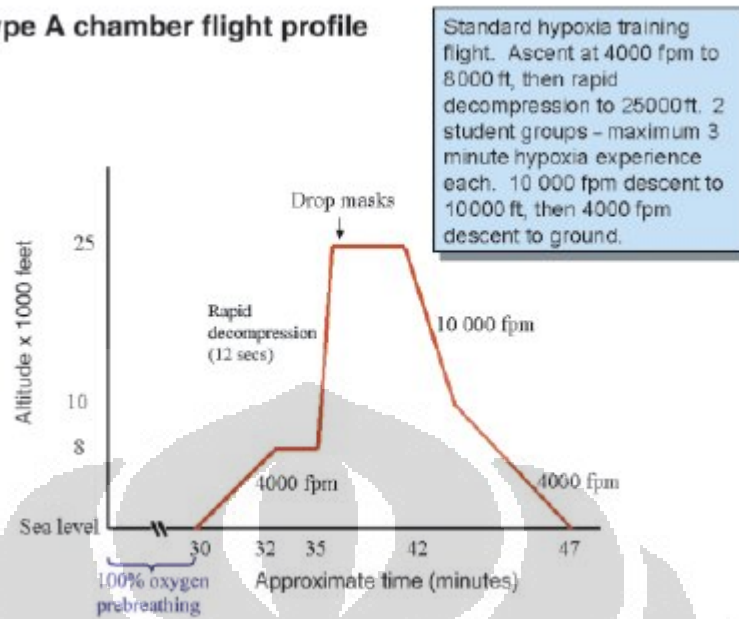
a. Prosedur *hypobaric chamber training* klasik

Prosedur ini dilakukan di banyak negara, termasuk negara-negara maju yang mengenalkan prosedur ini ke seluruh dunia.

Ada tiga tipe pelatihan:

1. *Type A Chamber Flight*. Merupakan latihan standar untuk mengenal dan mengingatkan kembali hipoksia dengan stimulasi ketinggian 25.000 kaki. Dengan pola sebagai berikut:

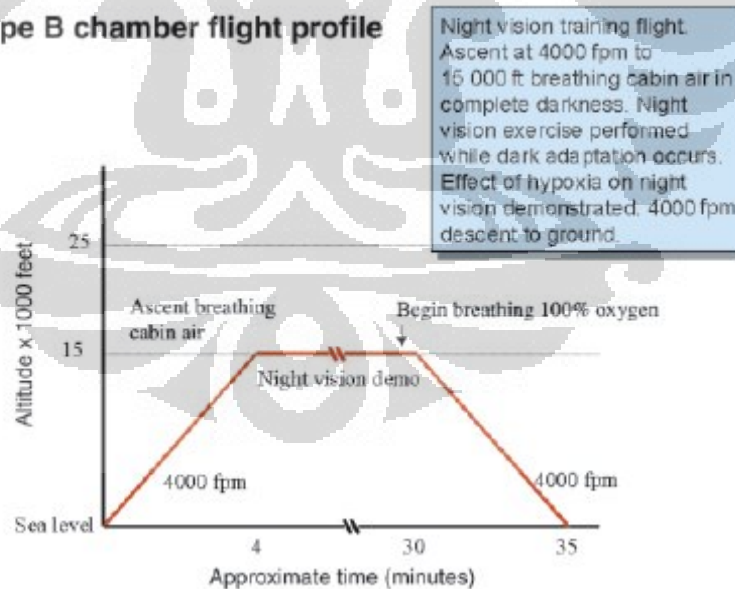
Type A chamber flight profile



Gambar 2.17. *Type A Chamber Flight Profile*

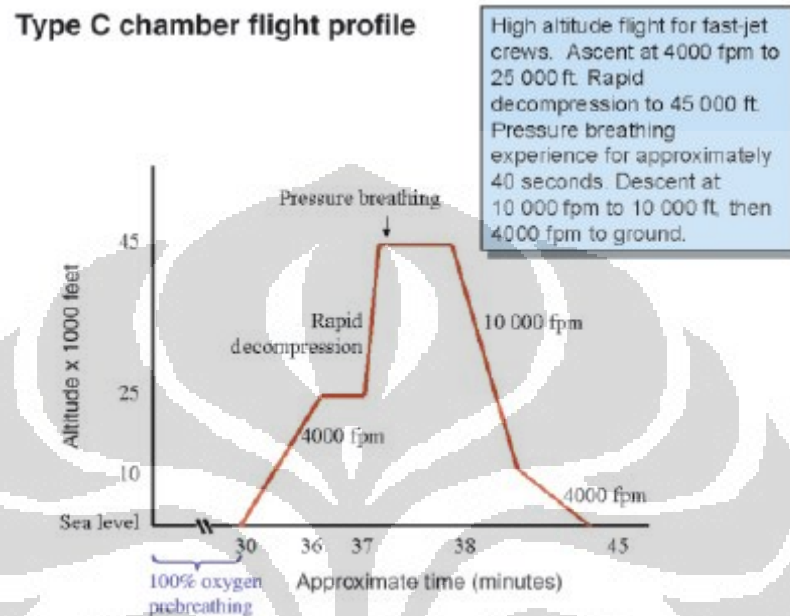
2. *Type B Chamber Flight*. Merupakan latihan hipobarik dan hipoksia pada penglihatan malam (*night vision*), dengan simulasi ketinggian 15.000 kaki.

Type B chamber flight profile



Gambar 2.18. *Type B Chamber Flight Profile*

3. *Type C Chamber Flight*. Merupakan pelatihan untuk mengenalkan dan mengingatkan kembali tekanan hipobarik. Simulasi ketinggian 45.000 kaki.



Gambar 2.19. *Type C Chamber Flight Profile*

- b. Prosedur *hypobaric chamber training* dengan teknik CADO

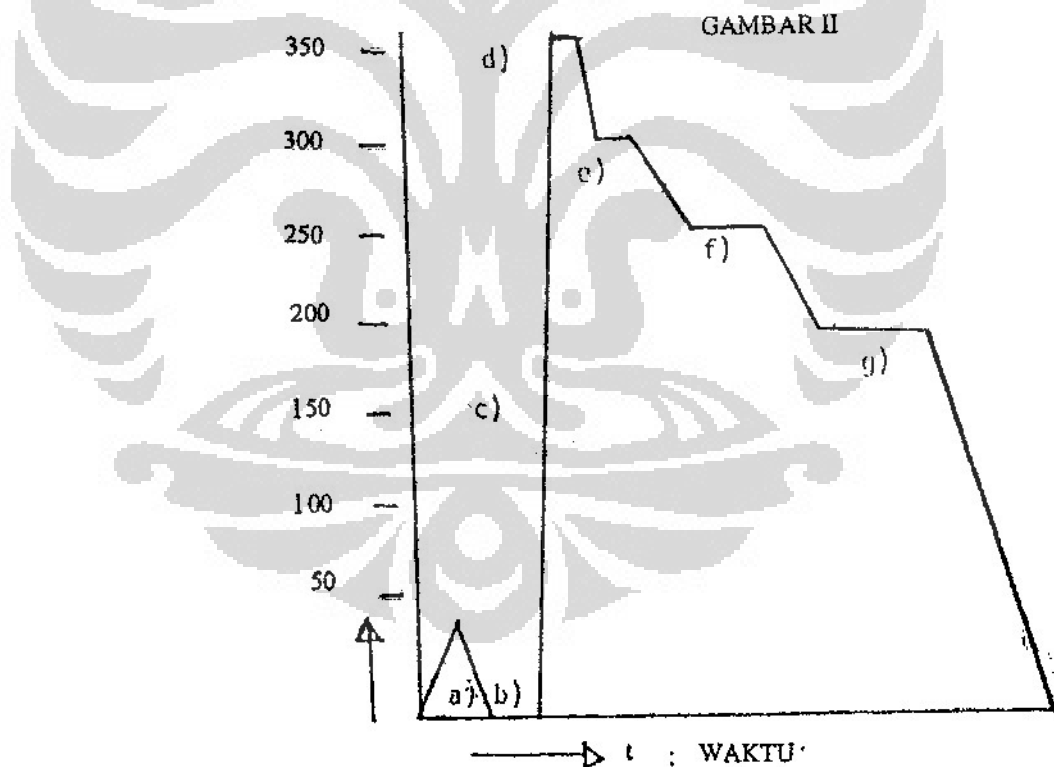
Prosedur ini mulai digunakan oleh Angkatan Bersenjata Australia (*Australian Defence Force/ADF*) sejak Desember 2001. Hingga tahun 2001 ADF masih menggunakan prosedur klasik, hingga tahun 2001 COMCARE (otoritas kesehatan dan keselamatan kerja Pemerintah Federal Australia) menghentikannya dan melarangnya, akibat banyaknya angka kecelakaan *decompression sickness* akibat penurunan dan kenaikan tekanan yang akut. Prosedur baru CADO (*Combined Altitude and Depleted Oxygen*), yang pertama kalinya di dunia diperkenalkan oleh Royal Australian Air Force's Institute of Aviation Medicine (AVMED) didesain dapat mengeliminasi risiko *decompression illness*, dengan cara menghirup udara yang kadar oksigennya direduksi seolah-olah pada ketinggian 25.000 kaki (sekitar 8% O₂) tanpa memberikan lingkungan

hipobarik 25.000 kaki, tetapi cukup dengan simulasi hipobarik pada ketinggian 10.000 kaki.

Di Lakespra Saryanto TNI AU, menggunakan prosedur seperti pada tipe klasik, namun dalam prakteknya sedikit berbeda:

1. ILA awal

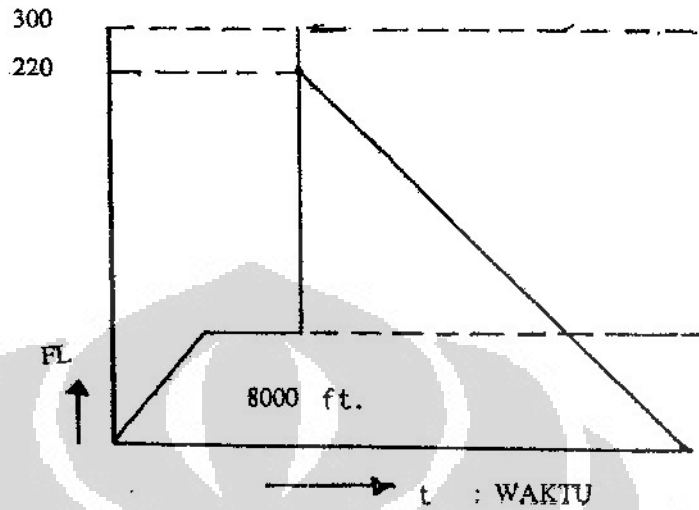
- a. *Type I chamber flight profile*. Dengan *standard rate of climb/descent* 5.000 kaki/menit, ke ketinggian 35.000 kaki, demonstrasi hipoksia akut pada 30.000 kaki, turun ke 25.000 kaki, dan kemudian dibuat perlakuan setelah hipoksia massal pada peserta pada 25.000 kaki selama 5 menit. Setelah itu turun ke 18.000 kaki dan dilakukan latihan penglihatan malam/*night vision training* (dengan lampu gelap).



Gambar 2.20. *Type I chamber flight profile*

- b. *Rapid decompression profile*. Hanya melakukan pelatihan yaitu mengenalkan adanya kemungkinan *rapid decompression*, sampai

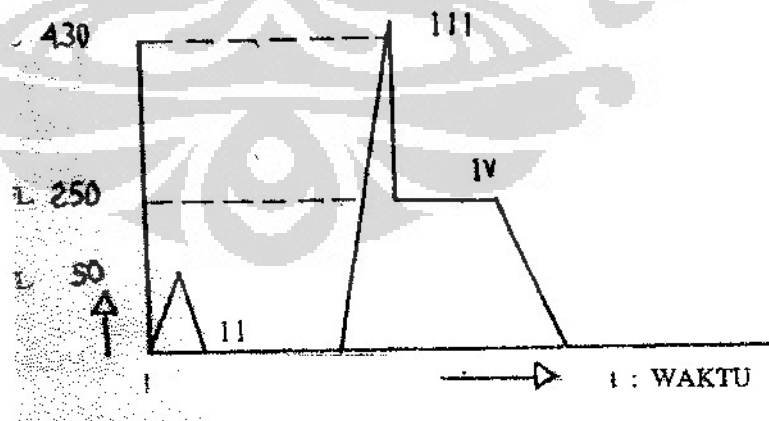
ketinggian 30.000 kaki langsung turun cepat ke 22.000 kaki, kemudian turun lebih lambat ke zona aman (dibawah 10.000 kaki).



Gambar 2.21. *Rapid decompression profile*

2. ILA penyegaran/refreshing

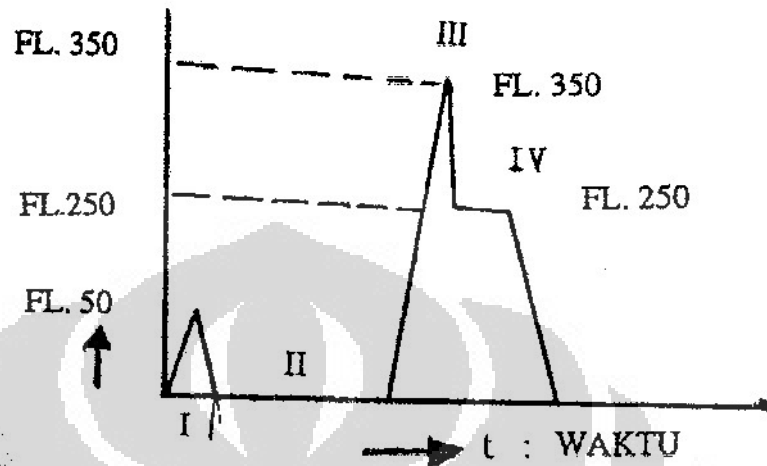
- a. *Type II chamber profile* (khusus penerbang tempur). Sampai ketinggian 43.000 kaki, dengan terus memakai masker dengan oksigen 100%.



Gambar 2.22. *Type II chamber profile*

- b. *Type II chamber flight profile* (untuk penerbang angkut). Sampai ketinggian 35.000 kaki, turun ke 25.000 kaki, perlakuan hipoksia

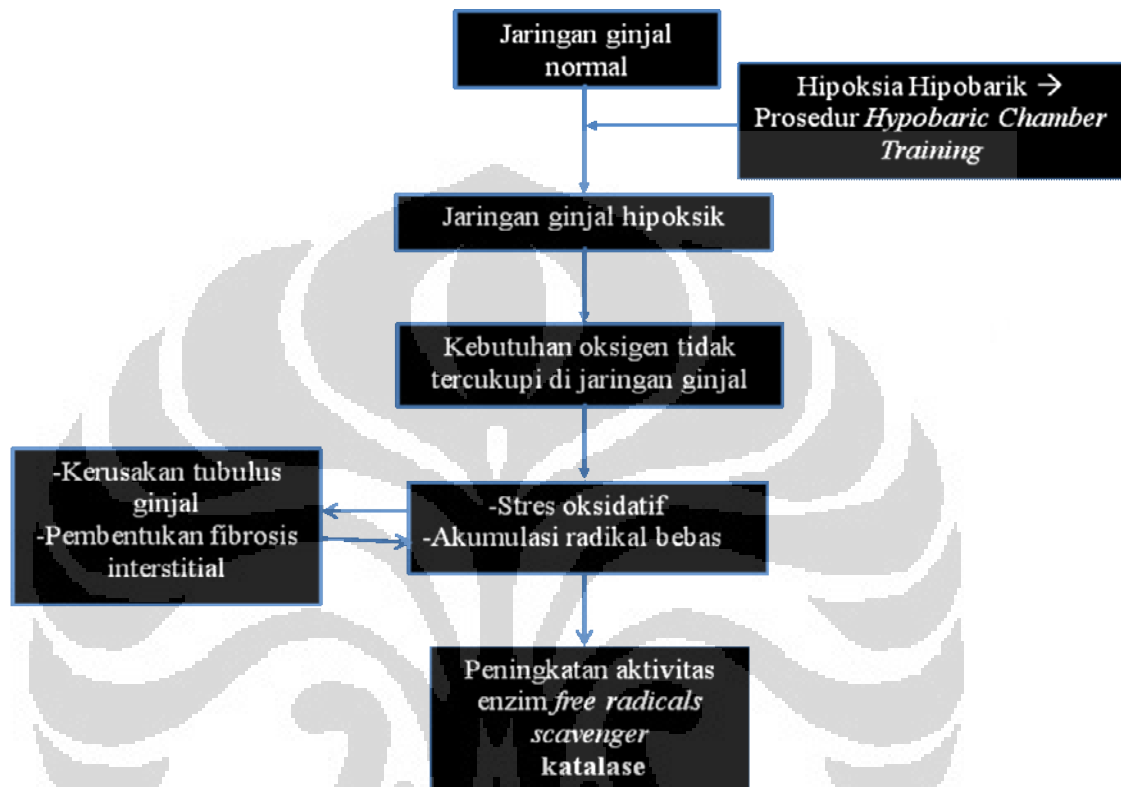
massal pada 25.000 kaki, kemudian turun dengan kecepatan 4.000-6.000 kaki/menit. Kemudian latihan *night vision* pada ketinggian 18.000 kaki.



Gambar 2.23. *Type II chamber flight profile*

2.6. Kerangka Konsep

Kaitan-kaitan antara beberapa variabel yang ada dan diperkirakan saling berkaitan dalam penelitian ini tergambar dalam skema kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 2.24. Bagan Kerangka konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

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

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengetahui aktivitas spesifik katalase dari sampel jaringan ginjal tikus 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 besar di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Penelitian tersebut membahas mengenai perubahan ekspresi gen *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 alpha* dan mikrovaskulatur di jaringan otak tikus percobaan akibat paparan hipoksia hipobarik akut berulang. Baik dari penelitian utama tersebut maupun penelitian ini menggunakan sampel tikus percobaan yang sama sehingga prosedur pengambilan sampel penelitian ini dilakukan bersamaan dengan pengambilan sampel penelitian utama. Peneliti hanya mendapatkan sampel setelah dilakukan perlakuan serta

pengambilan sampel (ginjal tikus percobaan) dilakukan di Lakespra Saryanto dan dibawa ke Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI.

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur Wistar berumur 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 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 organ ginjal diambil dan ditimbang.

3.4. Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

Kriteria inklusi adalah tikus percobaan yang tampak sehat dan 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 di jaringan ginjal 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 ginjal sesuai kriteria yang ditetapkan
- b. H₂O₂ 30% Merck
- c. Phosphate Buffer Saline (PBS)
- d. Na₂HPO₄ Merck
- e. KH₂PO₄ Merck
- f. NaCl Merck
- g. Aquabidest
- h. *Bovine Serum Albumine* (BSA) Merck
- i. Dan lain-lain

3.6.2.2. Alat

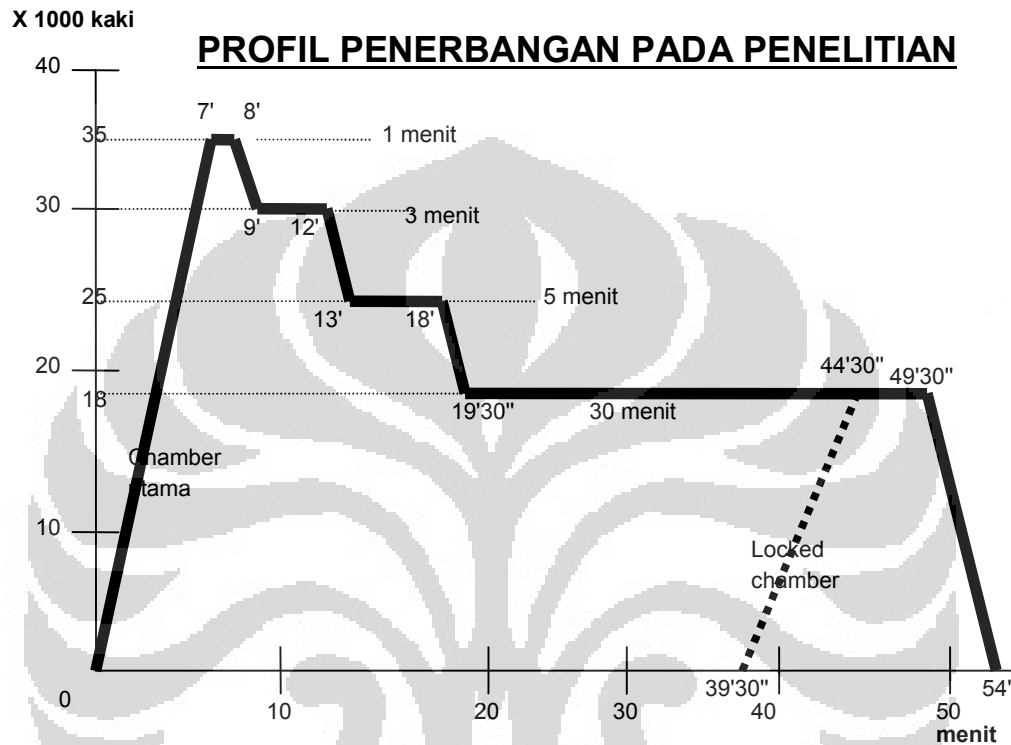
- a. Neraca analitik
- b. Mikropipet volume 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

- c. Tip mikropipet 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l
- 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 (Lakespra Saryanto)

- 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 climb* 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 descend* 5.000 kaki/menit.
- d. Dilakukan simulasi turun dari ketinggian 30.000 kaki ke ketinggian 18.000 kaki dengan *rate of descend* 5.000 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 climb*

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.



Gambar 3.1. Profil Penerbangan pada Penelitian

3.6.4. Pengambilan Sampel

- Di dalam *hypobaric chamber* dengan *setting* ketinggian 18.000 kaki, 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 ginjal dari masing-masing tikus.
- Sampel dimasukkan ke dalam kotak pendingin berisi es kering (*dry ice*).

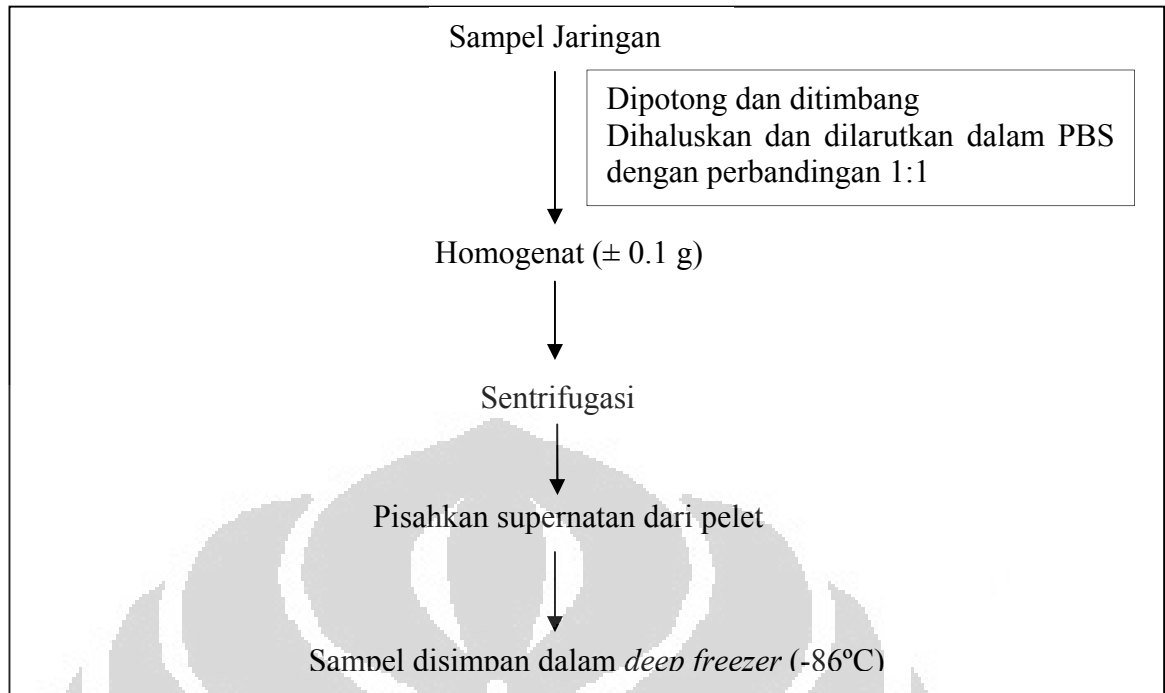
- d. Segera setelah pembedahan selesai dilakukan, dilakukan simulasi turun dari ketinggian 18.000 kaki ke ketinggian 0 kaki dengan *rate of descend* 4.000 kaki/menit.
- e. Sampel segera dikirimkan ke Laboratorium Biomolekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.6.5. Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0.05 M dengan pH 7. Sebanyak 5.4376 g Na₂HPO₄ ditambah dengan 2.6469 g KH₂PO₄ 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 ginjal 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 5.000 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. Pembuatan Homogenat Jaringan

3.6.7. Optimasi Pengukuran

Pengukuran aktivitas spesifik katalase ini menggunakan metode Mates et al. (1999)²⁴ 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 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 adalah pada panjang gelombang 210 nm.

3.6.7.3. Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh blanko setiap menit selama 10 menit. Dilakukan juga pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh sampel setiap menit selama 10 menit.

Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan memipetkan ke dalam kuvet 950 μL larutan H_2O_2 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 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 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 pH 7 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 aquabidest 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 untuk menghitung konsentrasi protein jaringan.

3.6.8.2. Penentuan Konsentrasi Protein Ginjal

Untuk menentukan konsentrasi protein pada ginjal, dilakukan pengukuran absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada pengenceran optimal pada panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel. Konsentrasi protein (mg/mL) ginjal 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 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). Semua hasil dicatat dalam tabel.

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

3.7. Pengolahan dan Analisis Data

Semua hasil perhitungan aktivitas spesifik katalase (Unit/mg protein) 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 dua kelompok data tak berpasangan. Jika sebaran data normal menurut uji normalitas Shapiro-Wilk, digunakan metode uji *one-way* ANOVA. Jika sebaran data tidak normal, digunakan metode uji Kruskal-Wallis.

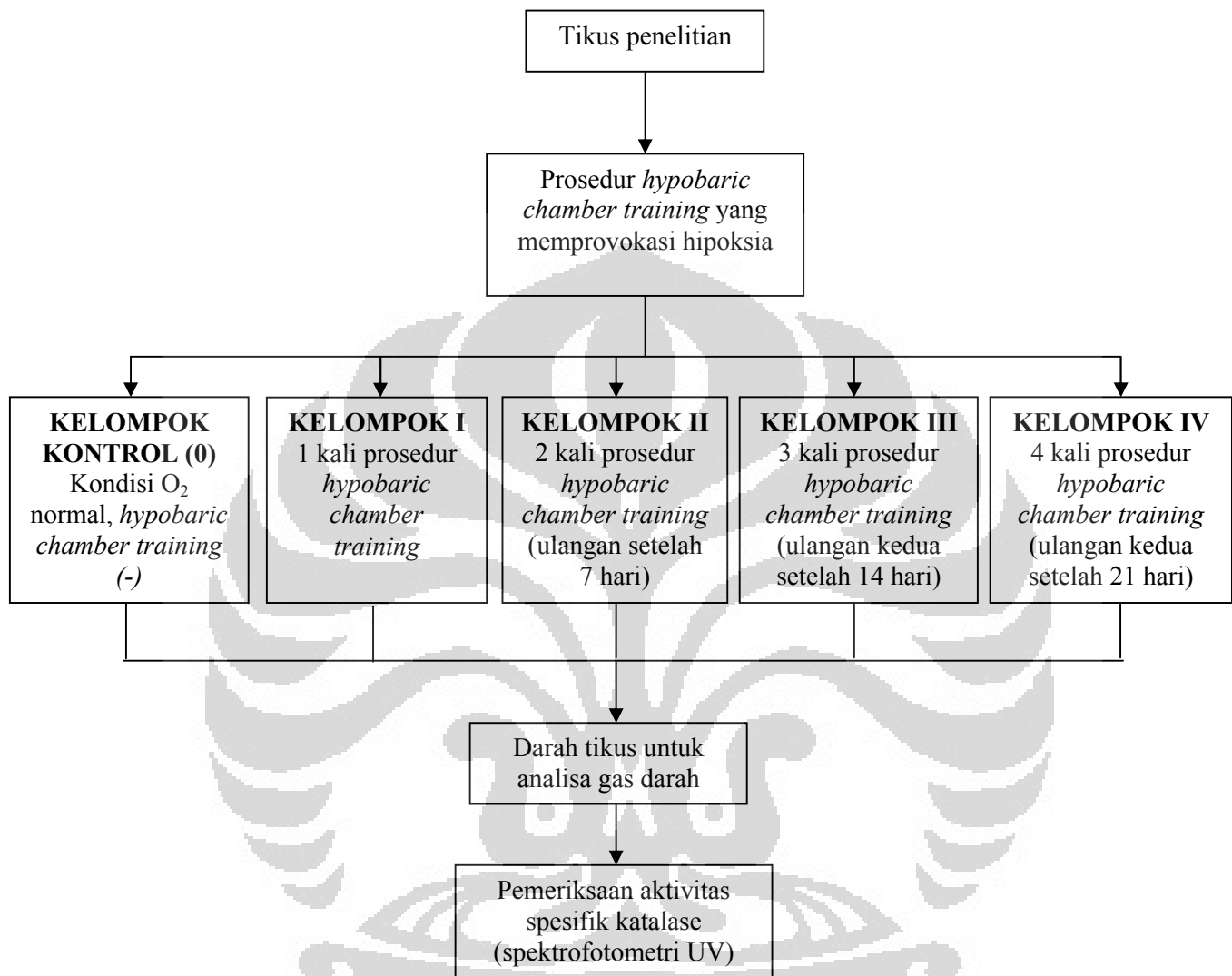
3.8. Pelaporan Data

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

3.9. Definisi Operasional

- a. 1 Unit (U) : jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi 1 μM 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 ($1 \text{ atm} = 760 \text{ Torr} = 101,325 \text{ Pa} = 1.01325 = \text{FiO}_2 \text{ 21\%}$).
- 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 waktu yang lain

3.10. Alur Penelitian



Gambar 3.3. Bagan Alur Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Pengukuran aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus percobaan pada keadaan hipoksia hipobarik akut berulang ini dilakukan berdasarkan metode Mates et al. (1999) yang dimodifikasi oleh Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Modifikasi yang dilakukan berupa pengukuran sendiri absorbansi optimal pada setiap langkah. Metode ini mengamati aktivitas katalase (CAT) yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan molekul O_2 secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang 210 nm karena H_2O_2 memperlihatkan serapan maksimal pada panjang gelombang ini. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase.

Ke dalam kuvet spektrofotometri, untuk blanko dimasukkan H_2O_2 1:4000 (pengenceran optimal) sebanyak 950 μ l. Pada blanko kemudian ditambahkan PBS 0.05 M pH 7 (bertindak sebagai buffer) sebanyak 50 μ l. Kemudian serapan diukur pada 210 nm. Sedangkan untuk bahan uji, dimasukkan sampel dengan pengenceran optimal sebanyak 50 μ l dan H_2O_2 1:4000 (pengenceran optimal) sebanyak 950 μ l. Serapan lalu diukur pada panjang gelombang yang sama. Untuk aktivitas katalase sendiri dilakukan perhitungan mengikuti rumus-rumus yang telah ada. Hasil perhitungan tersebut dinyatakan dalam satuan Unit/ml. Setelah itu, hasil perhitungan akan dibagi dengan konsentrasi protein jaringan dalam satuan mg/ml sehingga didapatkan hasil aktivitas spesifik katalase dalam satuan Unit/mg protein.

4.1. Hasil Optimasi Pengukuran

4.1.1. Penentuan Kinetik Katalase

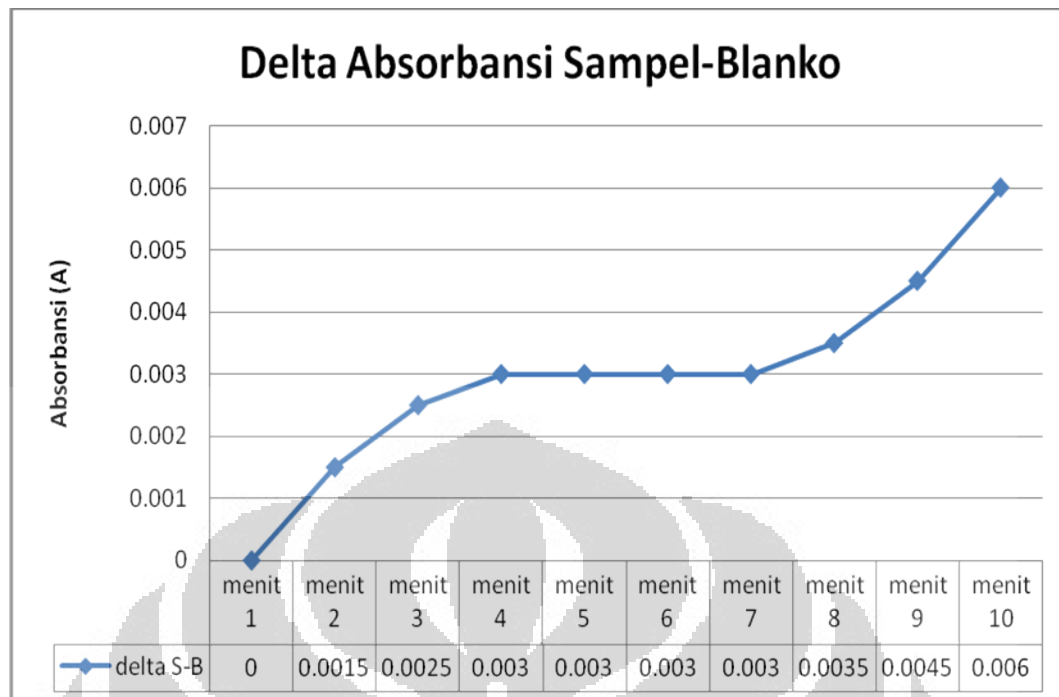
Penentuan ini dilakukan pada tanggal 1 Juni 2009 dengan sampel kontrol. Dari optimasi waktu didapatkan bahwa penguraian terbaik H_2O_2 oleh sampel dicapai pada menit ke-1 hingga menit ke-2, dengan selisih absorbansi 0.002 Å. Dari penghitungan kecepatan reaksi tiap satuan waktu yang didapat dari perbandingan selisih serapan dengan lama waktu pengukuran sejak menit ke-1 didapatkan kecepatan reaksi terbesar adalah pada menit ke-1 menuju menit ke-2,

dengan kecepatan 0.0015 Å/menit.

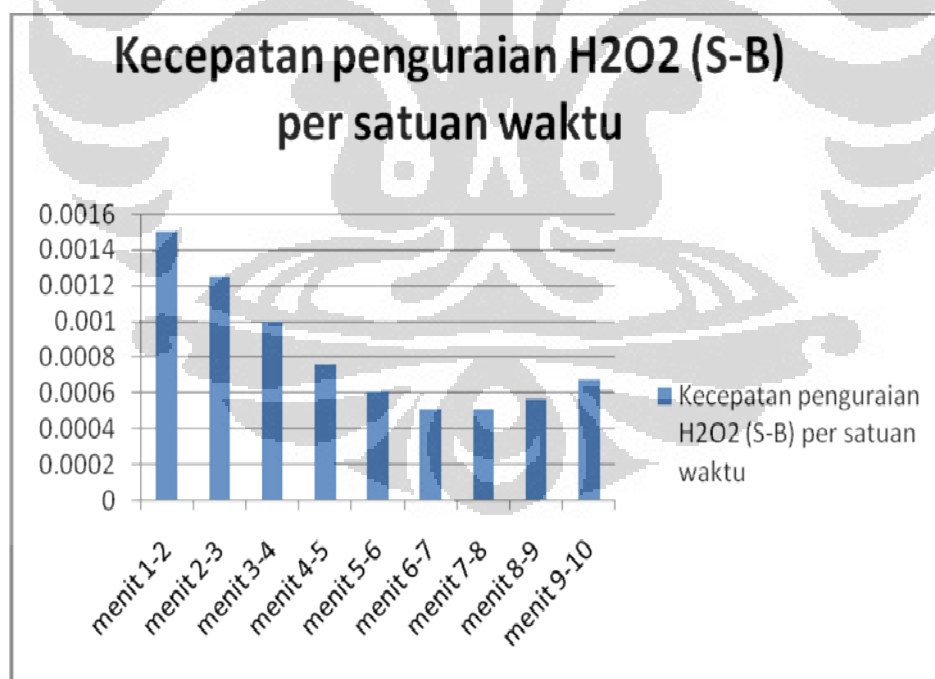
Menit ke-1 dijadikan waktu awal (t_0) karena penambahan 50 μL sampel ke dalam 950 μL H_2O_2 dilakukan setelah menit ke-0 sehingga pada menit ke-1 absorbansi meningkat karena pengaruh absorbansi sampel. Untuk mengurangi kerancuan selisih serapan akibat penambahan sampel, serapan diukur sejak menit ke-1.

Waktu	Blanko (Å)		Rata-rata Blanko	Sampel (Å)		Rata-rata Sampel	Delta Abs (B) t_1-t_n	Delta Abs (S) t_1-t_n	$\Delta S-\Delta B$	Kecepatan reaksi per satuan waktu (Å /menit)
	B1	B2		S1	S2					
1:00	0.232	0.232	0.232	0.230	0.245	0.238	0.000	0.000	0.000	0.0000
2:00	0.231	0.231	0.231	0.227	0.243	0.235	0.001	0.003	0.002	0.0015
3:00	0.231	0.230	0.231	0.226	0.241	0.234	0.002	0.004	0.003	0.0013
4:00	0.230	0.230	0.230	0.225	0.240	0.233	0.002	0.005	0.003	0.0010
5:00	0.230	0.229	0.230	0.225	0.239	0.232	0.003	0.006	0.003	0.0008
6:00	0.230	0.229	0.230	0.225	0.239	0.232	0.003	0.006	0.003	0.0006
7:00	0.230	0.229	0.230	0.224	0.240	0.232	0.003	0.006	0.003	0.0005
8:00	0.231	0.227	0.229	0.222	0.240	0.231	0.003	0.007	0.004	0.0005
9:00	0.230	0.227	0.229	0.219	0.240	0.230	0.004	0.008	0.005	0.0006
10:00	0.229	0.226	0.228	0.215	0.239	0.227	0.005	0.011	0.006	0.0007

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



Gambar 4.1. Grafik penguraian H_2O_2 oleh (S-B) pada tiap satuan waktu



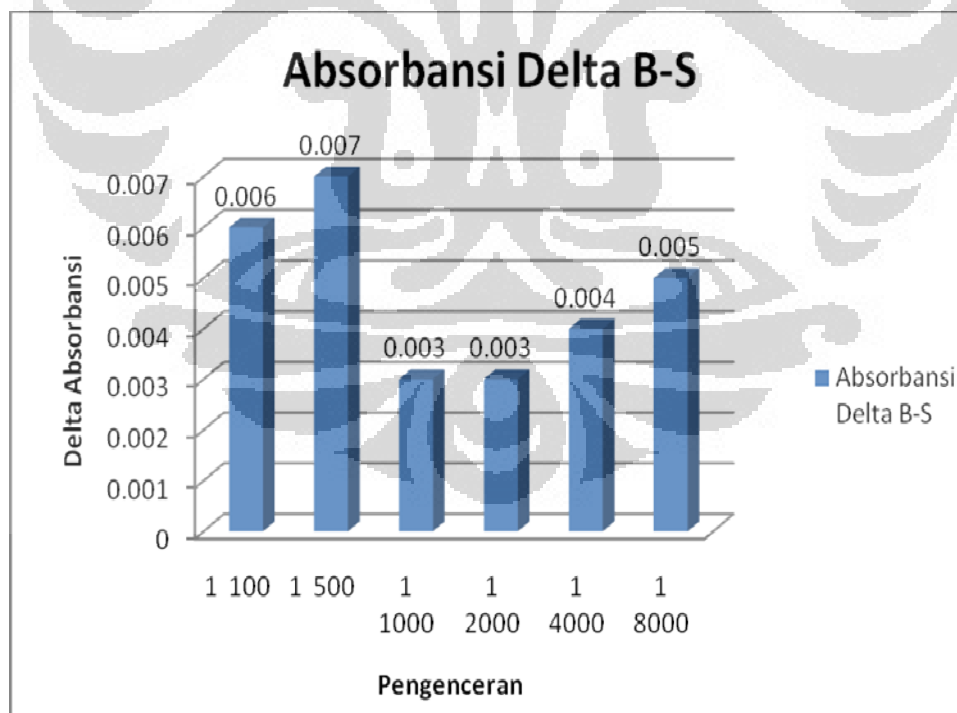
Gambar 4.2. Grafik kecepatan penguraian H_2O_2 oleh sampel tiap satuan waktu

4.1.2. Penentuan Pengenceran Optimal Sampel

Dari pengukuran penguraian H_2O_2 pada menit ke-1 (t_0) hingga menit ke-2 didapatkan bahwa penguraian terbesar yang dinyatakan dengan selisih serapan $\{\Delta \text{absorbansi (B-S)}\}$, baik dari menit ke-1 hingga menit ke-2 berlangsung. Penentuan dilakukan pada tanggal 1 Juni 2009 dengan sampel kontrol. Dari hasil pengukuran menunjukkan bahwa pengenceran optimal sampel ginjal adalah pada pengenceran sampel : PBS sebesar 1 : 500.

Pengenceran	Blanko		Sampel		$\Delta B-\Delta S$ (t_2-t_1)
	Rata-rata t_1	Rata-Rata t_2	Rata-rata t_1	Rata-Rata t_2	
1 100	0.423	0.421	0.313	0.305	0.006
1 500	0.423	0.421	0.315	0.306	0.007
1 1000	0.423	0.421	0.313	0.308	0.003
1 2000	0.423	0.421	0.323	0.318	0.003
1 4000	0.423	0.421	0.322	0.316	0.004
1 8000	0.423	0.421	0.334	0.327	0.005

Tabel 4.2. Hasil selisih absorbansi (B-S) pada berbagai pengenceran sampel



Gambar 4.3. Grafik penguraian H_2O_2 pada menit ke-1 hingga menit ke-2

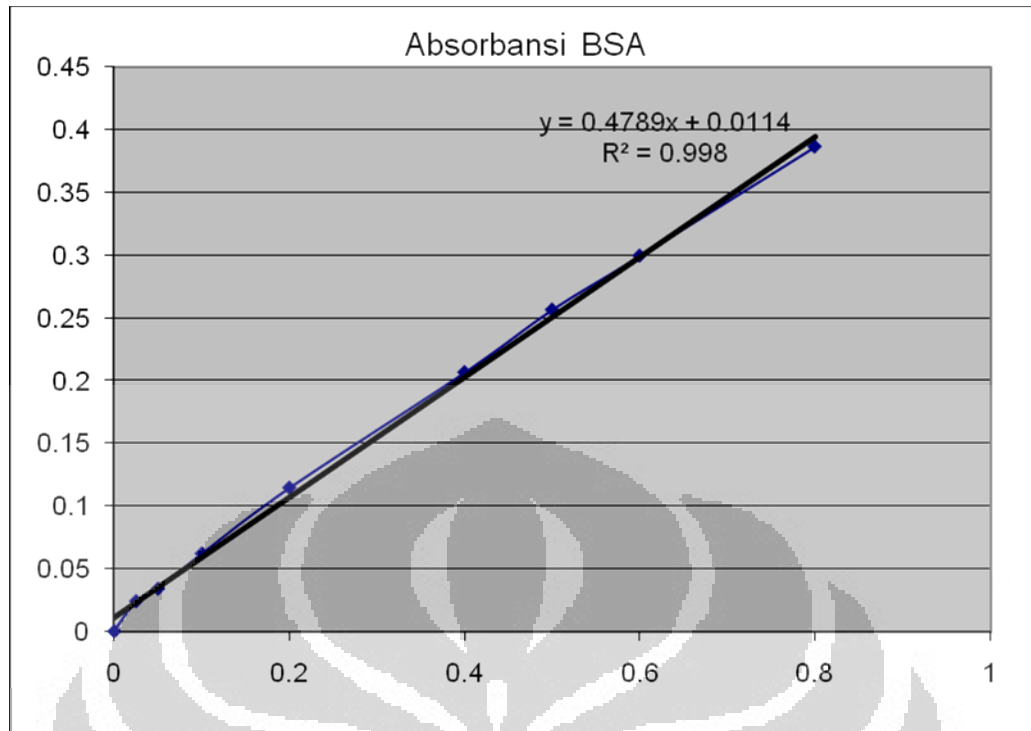
4.2. Penentuan Kadar Protein

4.2.1. Penentuan 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 satu. dari hasil kurva standar protein diperoleh nilai R^2 sebesar 0.998 untuk digunakan dalam perhitungan kadar protein jaringan. Penentuan kurva standar protein ini dilakukan pada tanggal 9 Juni 2009.

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi 280 nm		
	1	2	rata-rata
0	0	0	0
0.025	0.027	0.021	0.024
0.05	0.034	0.034	0.034
0.1	0.062	0.062	0.062
0.2	0.113	0.116	0.1145
0.4	0.204	0.209	0.2065
0.5	0.256	0.257	0.2565
0.6	0.298	0.301	0.2995
0.8	0.381	0.392	0.3865

Tabel 4.3. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi



Gambar 4.4. Grafik Kurva Standar Protein.

4.2.2. Penentuan Konsentrasi Protein Ginjal

Untuk menentukan konsentrasi protein pada ginjal, 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) ginjal kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penentuan konsentrasi protein ginjal dilakukan pada tanggal 9 Juni 2009 (tabel lampiran 2).

4.3. Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan U/mL atau μM per menit per mL. Satu unit berarti jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi 1 μM substrat per menit. Untuk pengukuran aktivitas katalase sampel, perlu diketahui molaritas larutan H_2O_2 . Molaritas H_2O_2 diperoleh melalui perhitungan-perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 30\%} &= 30 \text{ g H}_2\text{O}_2 \text{ dalam 100 mL larutan} \\ \text{Berat molekul (BM)} &= 34 \text{ g/mol} \\ \text{Berat jenis} &= 1.11 \text{ g/mL} \end{aligned}$$

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

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

Volume H₂O₂ murni dalam larutan H₂O₂ agar molaritasnya 10 mM

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

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

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

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

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

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

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_1 dengan absorbansi pada t_2 . Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H₂O₂ oleh blanko (Δ Absorbansi Uji - Δ Absorbansi Blanko).

Kemudian dihitung aktivitas katalase dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

Aktivitas katalase (U/mL)

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

$$= \frac{(\Delta A \text{ Uji} - \Delta A \text{ Blanko})/\text{menit}}{27.2 \times 0.05} \times 500$$

* 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.

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 protein).

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

4.4. Hasil Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

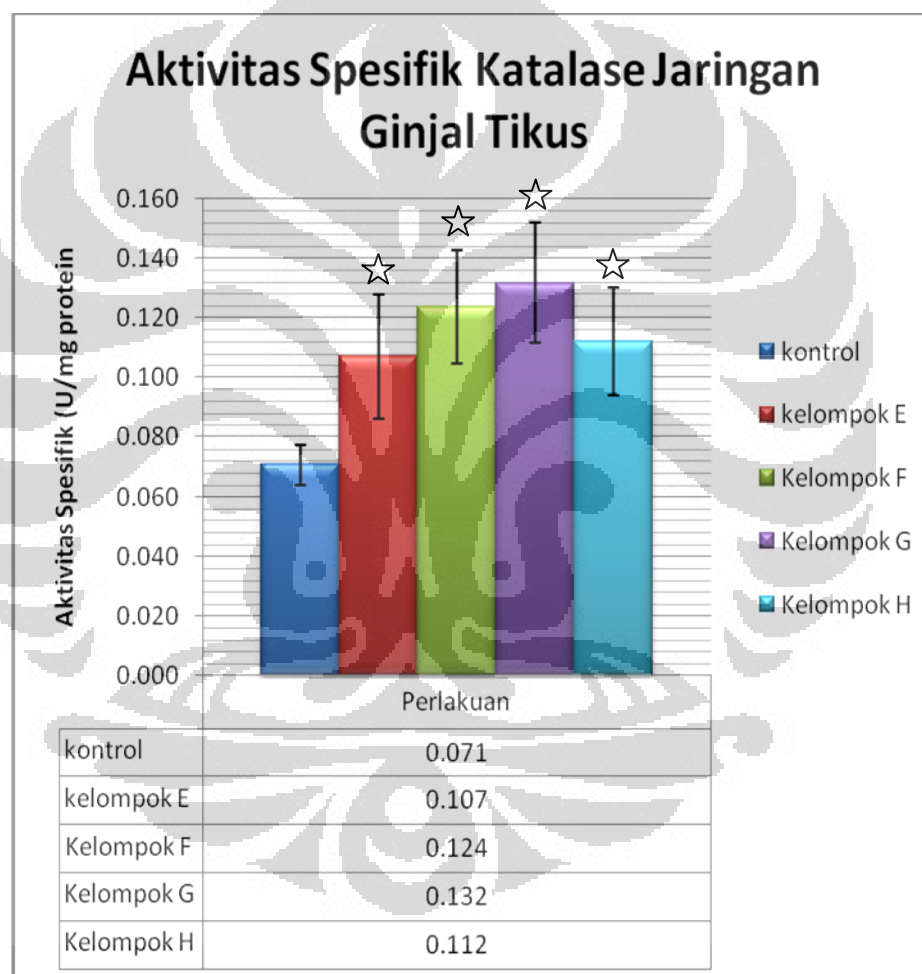
Hasil aktivitas spesifik katalase sampel jaringan berdasarkan pengukuran spektrofotometri dan perhitungan aktivitas spesifik enzim ditampilkan pada tabel berikut ini.

Sampel		Aktivitas spesifik Katalase (Unit/mg protein)
Kontrol	0	0.066
	0	0.067
	0	0.082
	0	0.072
	0	0.067
X±SD		0.071±0.0067
Kelompok I (1x Prosedur)	1	0.090
	1	0.087
	1	0.129
	1	0.098
	1	0.130
X±SD		0.107±0.021
Kelompok II (2x Prosedur)	2	0.116
	2	0.152
	2	0.116
	2	0.131
	2	0.103
X±SD		0.124±0.019
Kelompok III (3x Prosedur)	3	0.121
	3	0.129
	3	0.120
	3	0.167
	3	0.120
X±SD		0.132±0.02
Kelompok IV (4x Prosedur)	4	0.113
	4	0.133
	4	0.087
	4	0.126
	4	0.102
X±SD		0.112±0.018

Tabel 4.4. Aktivitas Spesifik Katalase Sampel Jaringan

Pengukuran aktivitas spesifik katalase ini menggunakan sampel total sebanyak dua puluh lima ekor tikus percobaan dimana masing-masing kelompok berjumlah lima ekor tikus percobaan. Data digambarkan sebagai rata-rata ± S.D. Dari hasil penelitian diperoleh rata-rata aktivitas spesifik katalase sampel jaringan pada kelompok kontrol sebesar 0.071±0.0067 U/mg protein. Sedangkan rata-rata

aktivitas spesifik katalase pada kelompok I sebesar 0.107 ± 0.021 U/mg protein, rata-rata pada kelompok II 0.124 ± 0.019 U/mg protein, rata-rata kelompok III 0.132 ± 0.02 U/mg protein, dan rata-rata kelompok IV sebesar 0.112 ± 0.018 U/mg protein. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik katalase semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase paling tinggi didapatkan pada kelompok III (perlakuan tiga kali prosedur *hypobaric chamber*) kemudian sedikit menurun pada kelompok selanjutnya (kelompok IV).



Gambar 4.5. Grafik aktivitas spesifik katalase ginjal tikus percobaan pada kelompok kontrol dan perlakuan hipoksia hipobarik akut berulang. Tanda ☆ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$).

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1. Perubahan Aktivitas Spesifik Katalase di Jaringan Ginjal Tikus yang diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang

Pajanan terhadap ketinggian (*High Altitude*) meningkatkan stres oksidatif dalam tubuh terutama pada organ-organ penting seperti jantung dan ginjal yang ditandai dengan meningkatnya peroksida lipid dan kerusakan DNA. Hipoksia yang terjadi di ketinggian dapat meningkatkan kebutuhan metabolik yang dapat memicu produksi radikal bebas.²⁵ Selain itu, terdapat faktor-faktor lingkungan dan perilaku yang umum terjadi di ketinggian seperti peningkatan pajanan terhadap sinar ultraviolet, inflamasi jaringan, serta peningkatan pengeluaran energi (*exercise*) yang dapat memicu pembentukan spesies oksigen reaktif itu sendiri. Dalam penelitian ini, untuk menghilangkan semua faktor luar tersebut, maka tikus percobaan dimasukkan ke dalam suatu *hypobaric chamber* sesuai dengan protokol yang ada.

Tubuh manusia pun mempunyai beberapa mekanisme untuk bertahan terhadap radikal bebas dan ROS lainnya. Pertahanan yang bervariasi saling melengkapi satu dengan yang lain karena bekerja pada oksidan yang berbeda atau dalam bagian seluler yang berbeda. Suatu garis pertahanan yang penting adalah sistem enzim, dimana salah satu enzim yang berperan adalah katalase.

Katalase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida mempunyai kemampuan untuk berdifusi ke dalam dan menembus membran sel sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada sel yang terletak jauh dari tempat H_2O_2 dibentuk. Hidrogen peroksida dalam tubuh dapat berasal dari berbagai sumber antara lain, proses transpor elektron di mitokondria oleh sitokrom oksidase yang mereduksi O_2 dengan menerima dua elektron dan reaksi dismutasi O_2^- yang dikatalisis oleh superoksida dismutase.

Ginjal merupakan organ tubuh dengan perfusi paling baik, namun tekanan oksigen jaringan pada parenkim ginjal jauh lebih rendah dibandingkan organ lain sehingga ginjal rentan terhadap keadaan hipoksia.⁸ Ketika hipoksia hipobarik (*high altitude*) terjadi, maka timbul suatu stres oksidatif pada jaringan ginjal.

Sebagai salah satu enzim antioksidan, aktivitas katalase akan meningkat ketika stres oksidatif itu terjadi. Peningkatan enzim antioksidan tersebut berhubungan dengan kerusakan pada protein dan lipid akibat meningkatnya radikal bebas oksigen dalam tubuh.

Dari hasil penelitian diperoleh adanya peningkatan aktivitas spesifik katalase semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase paling tinggi didapatkan pada kelompok III (perlakuan tiga kali prosedur *hypobaric chamber*) kemudian sedikit menurun pada kelompok selanjutnya (kelompok IV).

Untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna antara hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase kelompok kontrol dan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *one-way* ANOVA. Jika terdapat perbedaan bermakna antar perlakuan, untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna maka dilakukan uji Benferoni pada ANOVA. Syarat uji *one-way* ANOVA tersebut data harus mempunyai sebaran yang normal dan varians data yang sama. Untuk mengetahui apakah kumpulan data bersifat homogen dan terdistribusi secara normal, maka secara berurutan dilakukan uji homogenitas menurut Levene dan uji kenormalan menurut Saphiro Wilk. Dari hasil uji homogenitas menurut Levene, diketahui bahwa data bersifat homogen (Lampiran 4), dan hasil uji kenormalan menurut Saphiro Wilk diketahui bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal ($p > 0.05$). Oleh karena itu, pada data ini dapat dilakukan uji *one-way* ANOVA. Pada penelitian ini, data diolah menggunakan program SPSS 16.0.

Hasil ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara aktivitas spesifik katalase kelompok kontrol dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Sedangkan antar masing-masing kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Hasil uji ANOVA dapat dilihat lebih rinci pada tabel (lampiran 4).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan bermakna aktivitas spesifik katalase semua kelompok perlakuan hipoksia hipobarik akut berulang dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Selain itu, hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase paling tinggi didapatkan pada kelompok III (perlakuan

tiga kali prosedur *hypobaric chamber*) kemudian sedikit menurun pada kelompok selanjutnya (kelompok IV). Antar kelompok perlakuan menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna dalam peningkatan aktivitas spesifik katalase ($p > 0.05$).

Hal ini dapat menggambarkan keadaan stres oksidatif akut yang berulang sehingga terjadi peningkatan dari aktivitas katalase di jaringan ginjal tikus dengan puncak aktivitas katalase berada pada kelompok III (perlakuan tiga kali prosedur *hypobaric chamber*). Ginjal mengadaptasi peningkatan pembentukan ROS dan radikal bebas dengan meningkatkan senyawa-senyawa yang berperan dalam menetralsirnya.²¹ Beberapa penelitian juga menemukan peningkatan aktivitas superoksida dismutase, glutathion peroksida serta katalase dalam kondisi hipoksia. Penelitian oleh Rauchova et al (2002) yang membahas tentang pajanan hipoksia hipobarik akut secara intensif meningkatkan pembentukan peroksida lipid pada beberapa jaringan tubuh seperti jaringan otak dan darah yang mengindikasikan adanya stres oksidatif yang cukup tinggi. Hal ini diikuti oleh peningkatan aktivitas katalase sebagai enzim antioksidan.²⁶

Aktivitas spesifik katalase yang sedikit menurun pada kelompok IV dapat memperlihatkan adanya proses adaptasi. Studi pada manusia telah menunjukkan adanya proses adaptasi pada pajanan hipoksia akut berulang yang dapat meningkatkan kadar antioksidan dalam jaringan tubuh.²⁷

Pada keadaan hipoksia hipobarik akut yang berulang, mekanisme pertahanan antioksidan distimulasi, membran sel akan menjadi lebih stabil, dan transportasi oksigen ke jaringan akan meningkat. Pada beberapa studi dikemukakan bahwa pajanan berulang terhadap ketinggian dapat menimbulkan suatu aklimatisasi (*acclimatization*).

Pada pajanan yang berulang, dibandingkan dengan pajanan pertama sebelumnya terjadi peningkatan ventilasi dan saturasi oksigen darah arteri yang menandakan adanya peningkatan sensitivitas terhadap hipoksia itu sendiri. Ketika periode hipoksia lebih singkat daripada keadaan normoksia, dan jika pajanan diulangi selama beberapa hari, mekanisme pertahanan antioksidan akan meningkat lebih efektif daripada hipoksia yang berkepanjangan (*continuous*). Percobaan pada tikus yang dilakukan oleh Meerson et al (1992) menunjukkan bahwa pada hipoksia ringan di ketinggian 2.100 m dengan pajanan yang

berkepanjangan selama 30 hari akan menurunkan produksi peroksida lipid dan aktivitas antioksidan dalam jaringan seperti superoksida dismutase dan katalase. Namun ketika tikus tersebut terpajan keadaan hipoksia yang lebih berat pada ketinggian 5.000 m selama enam jam per hari dalam waktu tiga puluh hari, aktivitas antioksidan dalam jaringan tersebut meningkat dan produksi peroksida lipid dalam batas normal. Penemuan ini sejalan dengan konsep bahwa pajanan hipoksia akut berulang dapat menstimulasi peningkatan enzim antioksidan.²⁷

Penurunan aktivitas spesifik katalase pada kelompok dengan empat kali perlakuan prosedur *hypobaric chamber* (kelompok IV) juga dapat menggambarkan adanya peranan enzim lain selain katalase dalam hal menguraikan H_2O_2 . Selain katalase, H_2O_2 juga dapat diuraikan oleh GPx. Glutation peroksidase lebih cepat mengurai hidrogen peroksida karena memiliki afinitas lebih tinggi dibandingkan katalase sehingga memungkinkan terjadinya penurunan aktivitas katalase.¹³ Struktur katalase juga merupakan protein yang juga dapat dioksidasi oleh radikal bebas dan ROS, menyebabkan struktur protein rusak sehingga katalase dapat kehilangan aktivitasnya untuk menguraikan hidrogen peroksida.

5.2. Perbandingan dengan Hasil Penelitian Serupa pada Sampel Jaringan Hati dan Jantung

Pada rangkaian penelitian ini juga dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati yang dilakukan oleh Nugroho W dan jaringan jantung oleh Febriyanti S dengan perlakuan yang serupa di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tahun 2009. Sampel jaringan hati dan jantung berasal dari tikus percobaan yang sama dengan sampel jaringan ginjal.

Penelitian pada jantung tikus menunjukkan bahwa terjadi peningkatan dari aktivitas spesifik katalase di jaringan jantung tikus dengan puncak aktivitas spesifik katalase berada pada kelompok perlakuan dua kali prosedur *hypobaric chamber* yang kemudian menurun kembali pada tiga kali prosedur dan empat kali prosedur. Hal ini menunjukkan pula adanya proses adaptasi terhadap stress oksidatif yang diberikan secara akut berulang pada jantung.

Sedangkan pada jaringan hati, aktivitas spesifik katalase pada jaringan hati tikus yang mengalami hipoksia lebih rendah daripada pada jaringan non-hipoksik, menggambarkan adanya penurunan aktivitas spesifik katalase hati pada keadaan hipoksia. Hal ini dapat disebabkan perbedaan ekspresi gen enzim antioksidan pada jaringan hati dan ginjal, dimana hipoksia hipobarik dalam waktu singkat menyebabkan penurunan ekspresi gen enzim-enzim antioksidan di hati, namun meningkatkan ekspresi gen enzim-enzim serupa pada jaringan ginjal.²⁸ Mekanisme lain yang lebih mungkin untuk menjelaskan penurunan aktivitas spesifik katalase pada hati ialah autofagi. Hipoksia menginduksi ekspresi gen *hypoxc-induce factor* (HIF)-1 α , yang kemudian menginduksi autofagi pada sel-sel hati.²⁹

5.3. Kelebihan dan kekurangan Penelitian

Penelitian mengenai aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus percobaan pada keadaan hipoksia hipobarik akut secara berulang memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan baik dalam metode maupun dalam pelaksanaannya. Salah satu kelebihan penelitian ini yaitu pemilihan topik aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal tikus pada keadaan hipoksia hipobarik akut berulang yang belum pernah dilakukan secara eksperimental di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian ini bekerjasama dengan penelitian hipoksia hipobarik serupa di Lakespra Saryanto. Oleh karena itu, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian-penelitian selanjutnya yang membahas mengenai aktivitas enzim antioksidan lainnya pada keadaan hipoksia hipobarik tersebut.

Penelitian ini menggunakan data primer hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase di jaringan ginjal tikus percobaan yang dilakukan secara spektrofotometrik. Dalam teknis pelaksanaannya terdapat beberapa kendala yang menjadi kelemahan dalam penelitian ini. Kesalahan paralaks yang tidak dapat dihindari, persiapan alat-alat, sulitnya koordinasi dengan peneliti di Lakespra Saryanto serta faktor penggunaan alat spektrofotometri merupakan beberapa kendala teknis yang kerap dijumpai dalam penelitian ini.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Rata-rata aktivitas spesifik katalase sampel jaringan pada kelompok kontrol sebesar 0.071 ± 0.0067 U/mg protein. Sedangkan rata-rata aktivitas spesifik katalase pada kelompok I sebesar 0.107 ± 0.021 U/mg protein, rata-rata pada kelompok II 0.124 ± 0.019 U/mg protein, rata-rata kelompok III 0.132 ± 0.02 U/mg protein, dan rata-rata kelompok IV sebesar 0.112 ± 0.018 U/mg protein.
2. Terdapat perubahan yang bermakna berupa peningkatan aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal semua kelompok tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang terhadap kelompok kontrol (normal).
3. Aktivitas spesifik katalase paling tinggi didapatkan pada kelompok dengan perlakuan tiga kali prosedur *hypobaric chamber* kemudian sedikit menurun pada kelompok dengan perlakuan empat kali prosedur *hypobaric chamber*.
4. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna aktivitas spesifik katalase jaringan ginjal antar kelompok tikus perlakuan.

6.2. Saran

1. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan berupa jaringan ginjal utuh yang tidak dilakukan pemisahan antara bagian korteks dan medula. Sebaiknya dilakukan pemisahan jaringan ginjal antara korteks dan medula sehingga dapat memberikan gambaran lebih lanjut akan aktivitas spesifik enzim karena terdapat perbedaan fungsi dan metabolisme fisiologis antara korteks dan medula.
2. Katalase merupakan salah satu enzim yang turut berperan dalam katabolisme hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh stres oksidatif. Penelitian terhadap enzim-enzim antioksidan lainnya pada kondisi hipoksia hipobarik akut berulang seperti superoksida dismutase dan glutathion peroksida dapat memberikan gambaran yang lebih lengkap

tentang mekanisme pertahanan tubuh dalam melawan kerusakan oksidatif.

3. Diperlukan pula suatu penelitian terhadap metabolit kerusakan oksidatif yaitu kadar malondialdehid (MDA) agar memberikan gambaran mengenai aktivitas oksidan (radikal bebas) dalam sel.
4. Penelitian ini merupakan satu bagian dari penelitian utama mengenai peran gen HIF-1 alpha terhadap keadaan hipoksia hipobarik akut berulang yang sedang berjalan. Diharapkan kedua hasil penelitian ini ke depan dapat dibandingkan satu sama lain sehingga memberikan gambaran mengenai manfaat dan kerugian dari prosedur *Hypobaric chamber training*.
5. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat dan dampak prosedur *hypobaric chamber training* yang telah dilakukan oleh TNI Angkatan Udara di Lakespra Saryanto untuk para penerbang (peserta) khususnya dalam bidang kesehatan. Hal ini diperlukan untuk meninjau kembali efektivitas pelaksanaan prosedur tersebut terutama pada jangka waktu pelaksanaannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Martin D, Windsor J. From mountain to bedside: Understanding the clinical relevance of human acclimatisation to high altitude hypoxia. *Postgrad Med Journal*. vol. 84, 2008. [cited on June 17, 2009]. Available from: URL: pmj.bmj.com/cgi/content/full/84/998/622.
2. Anonymous. *Dasar-dasar ilmu kesehatan penerbangan*. Volume 2. Jakarta: Direktorat Kesehatan TNI AU, 1991.
3. Singh SN, *et.al*. Effect of high altitude (7,620m) exposure on glutathione and related metabolism in rats. *European Journal of Applied Physiology*. Vol 84(3), 2001.
4. Jolly Sr, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine Myocardial Reperfusion Injury: Its Reduction by the Combined Administration of Superoxide Dismutase and Catalase. *American Heart Association: Circulation research*. 1994. p277-285.
5. Nakanishi K, *et.al*. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol*, 489(Pt 3): 869–76, 1995. [cited on May 21, 2009]. Available from: URL: www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1156855.
6. Kumar V, Abas AA, Fausto N, editors. *Robins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 11-24, 74-5.
7. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p. 420-8.
8. I Gede P, Ketut S. Peran hipoksia pada patogenesis penyakit ginjal. [Diunduh 9 Juni 2009]. Tersedia dari: URL: http://ejournal.unud.ac.id/abstrak/8_peran_hipoksia_pada_patogenesis_penyakit_ginjal.pdf.
9. Craig Books, *et.al*. Characterization of cell clones isolated from hypoxia-selected renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292: 243-252, 2006. [cited on June 10, 2009]. Available from: URL: ajprenal.physiology.org/cgi/reprint/00236.2006v1.pdf.
10. Reiko Sunami, *et.al*. Acatalasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis exacerbates renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction.

- Am J Physiol Renal Physiol, 2004. [cited on June 10, 2009]. Available from: URL: ajprenal.physiology.org/cgi/content/short/00266.2003v1.
11. Anonymous. Buku Petunjuk Teknis TNI AU tentang Indoktrinasi dan Latihan Aerofisiologi Awak Pesawat ABRI/ TNI AU (Naskah Sementara). Jakarta: Mabes TNI AU; 1998.
 12. Bakonyi and Radak Z. High Altitude and Free Radicals. J Sports Sci and Med, vol 3, p.64-9, 2004. [cited on June 15, 2009]. Available from: URL: www.jssm.org/vol3/n2/6/v3s6pdf.pdf.
 13. Halliwell B and Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press; 1999. p.646-48.
 14. 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.
 15. Mark DH, *et al*. High altitude medicine. American Academy of Family Physicians, 1998. [cited on June 11, 2009]. Available from: URL: www.aafp.org/afp/980415ap/harris.html.
 16. Dennis O'Neil. Human biological adaptability: Adapting to high altitude. [cited on June 10, 2009]. Available from: URL: anthro.palomar.edu/adapt/adapt_3.htm.
 17. Blomgren K, Harberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. Free Radic Biol Med, 40(3), p.388-97, 2006.
 18. Sherwood L. Fisiologi Manusia: dari sel ke sistem. Jakarta: EGC, 2001.
 19. Ganong W. Buku ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 17. Jakarta: Penerbit EGC, 1995.
 20. Epstein FE, Agmon Y, Brezis M. Physiology of renal hypoxia: Molecular, cellular, and developmental biology of erythropoetin and erythropoiesis. Annals of the New York Academy of Sciences, 718: 72-82, 1994.
 21. Andrew M, Richard J, Erik R. Chronic kidney disease at high altitude. J Am Soc Nephrol 19: 2262–2271, 2008. [cited on June 16, 2009]. Available from: URL: jasn.asnjournals.org.

22. Widjaja S. Antioksidan Pertahanan Tubuh Terhadap Efek Oksidan dan Radikal Bebas. *Maj Ilm Fak Kedokteran USAKTI*. 1997; 16(1): 1659-72.
23. Murray, *et al.* Biokimia Harper. Edisi 25. Alih Bahasa Andry Hartono. Jakarta: Penerbit EGC; 2003.
24. Mates JM, *et al.* Interrelationship between Oxidative Damage and Antioxidant Enzyme Activities: An Easy and Rapid Experimental Approach. *Biochemical Education*. 1999; 28:93-5.
25. Andrew, *et al.* Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat Space Environ Med*, 75:881-8, 2004.
26. Rauchova, Vokurkova, Koudelova. Developmental changes of Erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia. *Physiol Res*, 54:527-532, 2005.
27. Tatiana V. Intermittent hypoxia research in the former soviet union and the commonwealth of independent states: History and Review of the concept and selected application. *High Altitude Medicine & Biology*, vol.3, No.2, 2002. [cited on June 15, 2009]. Available from: URL: www.pharmapacific.com/images/Hypoxia_in_USSR.pdf.
28. Martin, *et al.* Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys. [cited on June 19, 2009]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559417?dopt=AbstractPlus>.
29. Lleo A, *et al.* Autophagy: Highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *Journal of autoimmunity*, vol 29, 2007. [cited on June 19, 2009]. Available from: URL: www.sciencedirect.com.

Lampiran 1.

Protokol *Hypobaric Chamber* untuk Bedah Tikus

1. Dengan *standard rate of climb* 5.000 kaki/ menit, setting sampai ke ketinggian 35.000 kaki, dan dibuat perlakuan hipoksia akut selama 1 menit
2. Kemudian turun dengan *rate of descend* 5.000 kaki/menit ke ketinggian 30.000 kaki dan dibuat perlakuan hipoksia akut selama 3 menit.
3. Kemudian turun, *rate of descend* 5.000 kaki/menit, ke ketinggian 25.000 kaki, dan dibuat perlakuan hipoksia akut selama 5 menit.
4. Setelah itu turun lagi, dengan *rate of descend* 5.000 kaki/menit ke 18.000 kaki, dan dibuat perlakuan hipoksia selama 30 menit di ketinggian 18.000 kaki.
5. 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 climb* 4.000 – 5.000 kaki/menit.
6. 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.
7. Tikus di dalam kandang di ruang *hypobaric chamber* kemudian dibius total *deep anaesthesia* dengan cara memasukkan moncong kepalanya ke dalam kontainer khusus yang telah diisi eter cair, selama sekitar 1 s.d. 2 menit.
8. Setelah tikus tertidur dengan tenang, ditimbang, dan dilakukan bedah tikus sesuai protokol. Demikian diulang sampai 7 tikus sampel selesai dibedah.
9. Segera setelah pembedahan tikus selesai, kemudian dengan kecepatan 4.000 kaki / menit turun ke ketinggian ground level (0 kaki)
10. Selesai.

Lampiran 2.

Data Serapan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

Dilakukan pada tanggal 5 Juni 2009 dan 9 Juni 2009

Sampel	Rata-rata Serapan				Serapan $\Delta S-AB$	Aktivitas katalase (Unit/ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik Katalase (Unit/mg protein)	Rata-rata Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg protein)	
	Blanko		Sampel							
	t1	t2	t1	t2						
Kontrol	0	0.282	0.280	0.2855	0.2805	0.0030	1.1029	16.809	0.066	0.071
	0	0.282	0.280	0.2845	0.2800	0.0025	0.9191	13.677	0.067	
	0	0.282	0.280	0.2825	0.2770	0.0035	1.2868	15.765	0.082	
	0	0.282	0.280	0.2835	0.2785	0.0030	1.1029	15.243	0.072	
	0	0.282	0.280	0.2815	0.2770	0.0025	0.9191	13.677	0.067	
Kel. E	1	0.282	0.280	0.2705	0.2640	0.0045	1.6544	18.375	0.090	0.107
	1	0.282	0.280	0.2670	0.2610	0.0040	1.4706	16.809	0.087	
	1	0.282	0.280	0.2705	0.2635	0.0050	1.8382	14.199	0.129	
	1	0.282	0.280	0.2675	0.2620	0.0035	1.2868	13.155	0.098	
	1	0.282	0.280	0.2665	0.2580	0.0065	2.3897	18.375	0.130	
Kel. F	2	0.282	0.280	0.2665	0.2605	0.0040	1.4706	12.633	0.116	0.124
	2	0.282	0.280	0.2695	0.2625	0.0050	1.8382	12.111	0.152	
	2	0.282	0.280	0.2645	0.2585	0.0040	1.4706	12.633	0.116	
	2	0.282	0.280	0.2665	0.2585	0.0060	2.2059	16.809	0.131	
	2	0.282	0.280	0.2710	0.2640	0.0050	1.8382	17.853	0.103	
Kel. G	3	0.282	0.280	0.2680	0.2620	0.0040	1.4706	12.111	0.121	0.132
	3	0.282	0.280	0.2700	0.2630	0.0050	1.8382	14.199	0.129	
	3	0.282	0.280	0.2645	0.2570	0.0055	2.0221	16.809	0.120	
	3	0.282	0.280	0.2640	0.2565	0.0055	2.0221	12.111	0.167	
	3	0.282	0.280	0.2670	0.2595	0.0055	2.0221	16.809	0.120	
Kel. H	4	0.282	0.280	0.2620	0.2550	0.0050	1.8382	16.287	0.113	0.112
	4	0.282	0.280	0.2670	0.2595	0.0055	2.0221	15.243	0.133	
	4	0.282	0.280	0.2660	0.2600	0.0040	1.4706	16.809	0.087	
	4	0.282	0.280	0.2620	0.2555	0.0045	1.6544	13.155	0.126	
	4	0.282	0.280	0.2670	0.2605	0.0045	1.6544	16.287	0.102	

Lampiran 3.
Uji Normalitas Distribusi Data

Descriptives			Statistic	Std. Error
Aktivitas katalase	Mean		.108960	.0053717
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.097873	
		Upper Bound	.120047	
	5% Trimmed Mean		.108278	
	Median		.116000	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.0268584	
	Minimum		.0660	
	Maximum		.1670	
	Range		.1010	
	Interquartile Range		.0420	
	Skewness		.020	.464
	Kurtosis		-.471	.902

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Aktivitas katalase	.123	25	.200*	.956	25	.348

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Shapiro Wilk

Hipotesis : H_0 = data terdistribusi normal

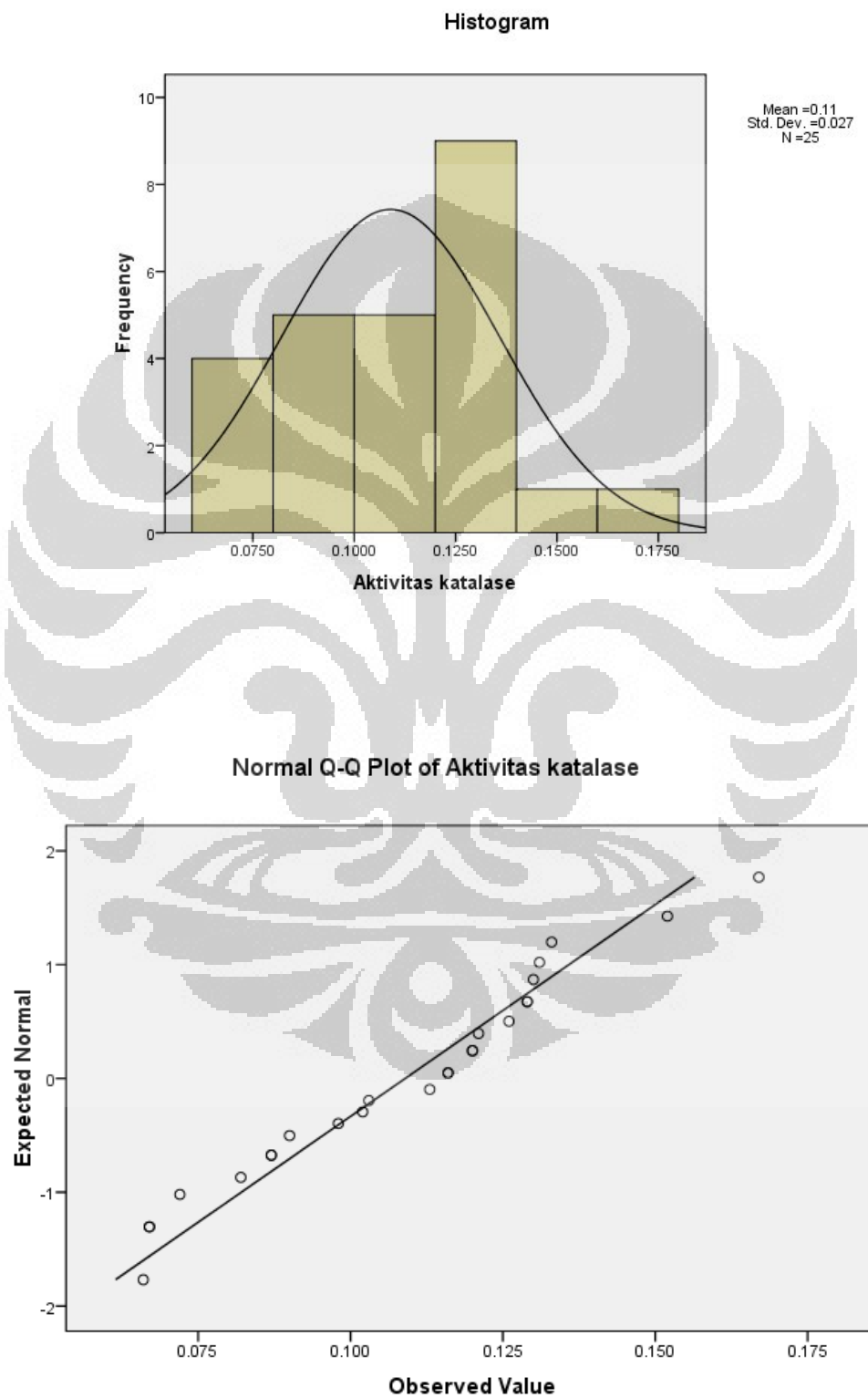
H_1 = data tidak terdistribusi normal

Pengambilan kesimpulan:

Nilai signifikansi ≥ 0.05 , maka H_0 diterima. Nilai signifikansi < 0.05 , maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 diterima sehingga data terdistribusi normal

(lanjutan)



Lampiran 4.
Uji *One-Way* ANOVA

ANOVA

Aktivitas katalase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.011	4	.003	8.596	.000
Within Groups	.006	20	.000		
Total	.017	24			

Tujuan: mengetahui ada atau tidaknya perbedaan hasil secara bermakna antar setiap perlakuan atau tidak.

Hipotesis :

- Ho = hasil antar setiap perlakuan tidak berbeda secara bermakna
- H1 = hasil antar setiap perlakuan berbeda secara bermakna

p : 0,05

Pengambilan keputusan :

- jika nilai signifikansi $\geq 0,05$, maka Ho diterima
- jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka Ho ditolak

Kesimpulan: Ho ditolak sehingga aktivitas spesifik katalase antar kelompok berbeda secara bermakna.

(lanjutan)

Uji Homogenitas Varians

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas katalase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.541	4	20	.229

Hipotesis:

- Ho = data bervariasi homogen
- Ha = data tidak bervariasi homogen

Uji statistik : uji Levene

p : 0,05

Pengambilan kesimpulan :

- jika nilai signifikansi $\geq 0,05$, maka Ho diterima
- jika nilai signifikansi $< 0,05$, maka Ho ditolak

Kesimpulan:

- Ho diterima sehingga data bervariasi homogen

(lanjutan)

Uji Bonferroni terhadap Aktivitas Spesifik Katalase Ginjal (Unit per mg Protein) semua Kelompok Perlakuan

Multiple Comparisons

Aktivitas katalase

Bonferroni

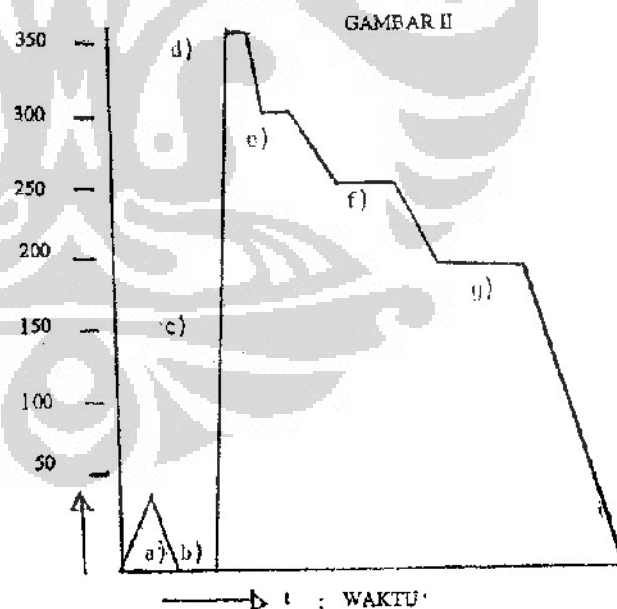
(I) Perlakuan pada tikus	(J) Perlakuan pada tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1x prosedur	-.0360000*	.0112843	.046	-.071584	-.000416
	2x prosedur	-.0528000*	.0112843	.001	-.088384	-.017216
	3x prosedur	-.0606000*	.0112843	.000	-.096184	-.025016
	4x prosedur	-.0414000*	.0112843	.015	-.076984	-.005816
1x prosedur	Kontrol	.0360000*	.0112843	.046	.000416	.071584
	2x prosedur	-.0168000	.0112843	1.000	-.052384	.018784
	3x prosedur	-.0246000	.0112843	.414	-.060184	.010984
	4x prosedur	-.0054000	.0112843	1.000	-.040984	.030184
2x prosedur	Kontrol	.0528000*	.0112843	.001	.017216	.088384
	1x prosedur	.0168000	.0112843	1.000	-.018784	.052384
	3x prosedur	-.0078000	.0112843	1.000	-.043384	.027784
	4x prosedur	.0114000	.0112843	1.000	-.024184	.046984
3x prosedur	Kontrol	.0606000*	.0112843	.000	.025016	.096184
	1x prosedur	.0246000	.0112843	.414	-.010984	.060184
	2x prosedur	.0078000	.0112843	1.000	-.027784	.043384
	4x prosedur	.0192000	.0112843	1.000	-.016384	.054784
4x prosedur	Kontrol	.0414000*	.0112843	.015	.005816	.076984
	1x prosedur	.0054000	.0112843	1.000	-.030184	.040984
	2x prosedur	-.0114000	.0112843	1.000	-.046984	.024184
	3x prosedur	-.0192000	.0112843	1.000	-.054784	.016384

* . The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5.
Jadwal Tahapan Penelitian

Tahap I s.d. IV di Gedung *Hypobaric Chamber*, Lakespra Saryanto, Jakarta

- Tahap I (hari 0) : pengumpulan tikus dan pengelompokan dalam 3 kelompok di Lakespra Saryanto
- Tahap II (hari 7) : kelompok Kontrol (tikus normal, tanpa intervensi) → diambil darahnya untuk Analisa Gas Darah, diambil jaringan hati, jantung, dan ginjal untuk disimpan dalam suhu -80°C .
- Tahap III (hari 8) : kelompok Perlakuan (I, II, III, IV) dimasukkan ke dalam *hypobaric chamber*, dilakukan 1 kali prosedur ***ILA awal Type I chamber flight profile*** pada semua kelompok tersebut.



- Tahap IV (hari 8) : khusus kelompok I, segera setelah tahap III selesai, diambil darahnya untuk Analisa Gas Darah, diambil jaringan hati, jantung, dan ginjal untuk disimpan dalam suhu -80°C .
- Tahap V (hari 15) : kelompok II, III, dan IV dilakukan prosedur ***ILA penyegaran/***

(lanjutan)

refreshing, Type II chamber flight profile (khusus penerbang angkut).

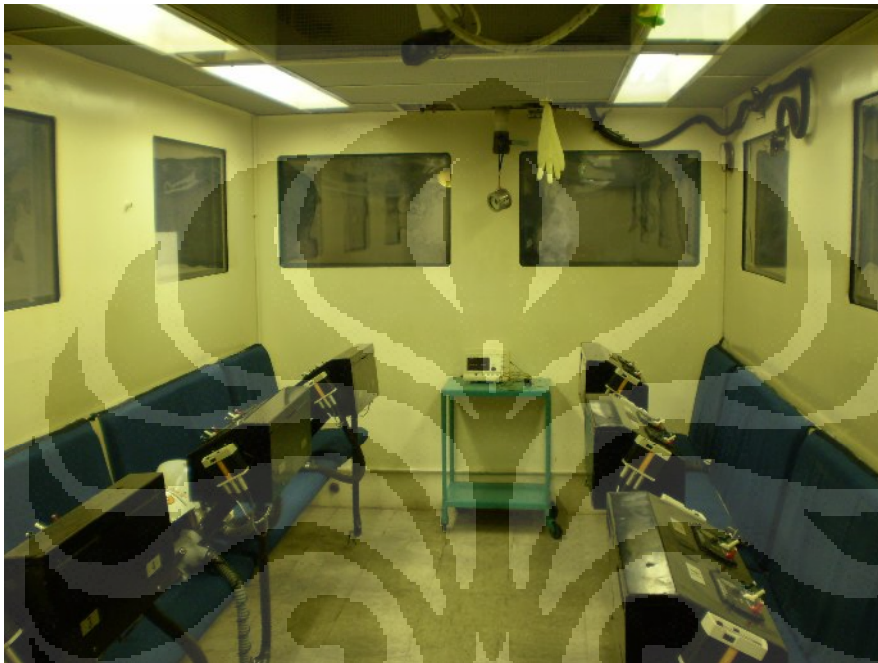
- Tahap VI (hari 15) : khusus kelompok II segera setelah tahap V selesai, diambil darahnya untuk Analisa Gas Darah, diambil jaringan hati, jantung, dan ginjal untuk disimpan dalam suhu -80°C .
- Tahap VII (hari 22) : kelompok III dan IV dilakukan prosedur **ILA penyegaran/ refreshing, Type II chamber flight profile (khusus penerbang angkut).**
- Tahap VIII (hari 22) : khusus kelompok III segera setelah tahap VII selesai, diambil darahnya untuk Analisa Gas Darah, diambil jaringan hati, jantung, dan ginjal untuk disimpan dalam suhu -80°C .
- Tahap IX (hari 29) : kelompok IV dilakukan prosedur **ILA penyegaran/ refreshing, Type II chamber flight profile (khusus penerbang angkut).**
- Tahap X (hari 29) : kelompok IV segera setelah tahap IX selesai, diambil darahnya untuk Analisa Gas Darah, diambil jaringan hati, jantung, dan ginjal untuk disimpan dalam suhu -80°C .

Sampel kemudian dibawa ke FKUI.

Selanjutnya tahap XI-XVI dilakukan di Departemen Biokimia FKUI:

- Tahap XI : dibuat homogenat dari jaringan hati, jantung, dan ginjal yang telah disimpan pada suhu -80°C .
- Tahap XII : dilakukan optimasi waktu dan pengenceran homogenat
- Tahap XIII : dilakukan pengukuran secara spektrofotometri pada seluruh sampel untuk mengetahui aktivitas enzim katalase.
- Tahap XIV : menyusun data-data hasil penelitian.
- Tahap XV : membuat analisis statistik hasil penelitian.
- Tahap XVI : membuat laporan hasil penelitian.

Lampiran 6.
Hypobaric Chamber Training di Lakespra Saryanto



Lampiran 7.

Nilai Analisis Gas Darah Tikus Percobaan

Perlakuan dan pengumpulan sampel dilakukan pada tujuh ekor tikus agar jumlah sampel minimal yaitu lima ekor tikus pada tiap kelompok tetap terpenuhi meskipun terdapat tikus yang tidak memenuhi kriteria inklusi (misal: tikus mati saat prosedur). Berikut adalah hasil pemeriksaan analisis gas darah (darah diambil dari arteri di jantung kiri) tikus pada kelompok tikus setelah perlakuan hipoksia hipobarik.

Kelompok 1 (1x perlakuan prosedur *hypobaric chamber*)

Tikus	Berat (gram)	pH	pCO ₂	pO ₂	SatO ₂	[K]O ₂	BE	BB	HCO ₃	tCO ₂
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	2,5	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

Kelompok 2 (2x perlakuan prosedur *hypobaric chamber*)

Tikus	Berat (gram)	pH	pCO ₂	pO ₂	SatO ₂	[K]O ₂	BE	BB	HCO ₃	tCO ₂
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	-12,3	-12,1	17,8	19,8
F4	215	6,929	79,7	2,8	1,1	0,2	-16,0	-16,4	16,5	18,8
F5	220	6,915	69,5	7,3	2,9	0,6	-18,7	-18,8	13,9	16,0
F6	205	7,023	70,4	1,5	0,6	0,1	-12,8	-13,1	18,1	20,2
F7	215	7,104	56,1	1,3	0,6	0,1	-12,2	-11,7	17,4	19,1

(lanjutan)

Kelompok 3 (3x perlakuan prosedur *hypobaric chamber*)

Tikus	Berat (gram)	pH	pCO ₂	pO ₂	SatO ₂	[K]O ₂	BE	BB	HCO ₃	tCO ₂
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

Kelompok 4 (4x perlakuan prosedur *hypobaric chamber*)

Tikus	Berat (gram)	pH	pCO ₂	pO ₂	SatO ₂	[K]O ₂	BE	BB	HCO ₃	tCO ₂
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