AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM *MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE*, KATALASE DAN GLUTAMAT PIRUVAT TRANSAMINASE PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK : HUBUNGANNYA DENGAN KERUSAKAN OKSIDATIF

TESIS

MASAGUS ZAINURI
NPM: 0806476803

UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
2010

AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM *MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE,* KATALASE DAN GLUTAMAT PIRUVAT TRANSAMINASE PADA HATI TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK : HUBUNGANNYA DENGAN KERUSAKAN OKSIDATIF

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. Biomed)

MASAGUS ZAINURI
NPM: 0806476803

UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Masagus Zainuri

NPM : 0806476803

Tanda Tangan :

Tanggal : 7 Juni 2010

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh	:
Nama	: Masagus Zainuri
NPM	: 0806476803
Program Studi	: Ilmu Biomedik
Judul Tesis	: Aktivitas spesifik enzim *manganese superoxide dismutase,* katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik : Hubungannya dengan kerusakan oksidatif

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr.rer.physiol,dr. Septelia Inawati Wanandi ( )

Pembimbing II : drg. Dwirini Retno Gunarti, MS ( )

Penguji I : dr. Sri Widia A.Jusman, MS ( )

Penguji II : Prof.dr. Frans D. Sujatna, SpFK, PhD ( )

Penguji III : Prof.HJ.Freisleben, PhD

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 7 Juni 2010

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI :
Dr.rer.physiol,dr. Septelia Inawati Wanandi ( )

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik, pada Program Magister Ilmu Biomedik, Kekhususan Biokimia pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa dalam masa perkuliahan sampai pada masa penyusunan tesis ini, saya menerima bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. rer. Physiol., dr. Septelia Inawati Wanandi sebagai dosen pembimbing tesis I dan drg. Dwirini, M.Biomed sebagai dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan dan memberikan bimbingan kepada saya selama menempuh pendidikan Magister Biomedik di FKUI ini.
2. Kepala Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, Ketua Program Magister Ilmu Biomedik, Ketua Program Studi Kekhususan Biokimia, para dosen, staf pengajar, dan pegawai-pegawai di Program Studi Kekhususan Biokimia dan Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan bantuan selama penulisan tesis.
3. Bapak Dr.Triono Soendoro mantan Kepala Badan Litbangkes yang telah memberikan kesempatan bagi CPNS untuk sekolah.
4. Bapak Dr.Trihono selaku Ketua Program PADI dan Kapuslit Ekologi dan Status Kesehatan terima kasih atas perhatian, arahan, bimbingan, dan doa.
5. Bapak Prof. Dr. Agus Purwadianto selaku Kepala Badan Litbang Depkes RI.
6. Bapak Nagiot Cansalony Tambunan dan seluruh staf pengembangan pegawai Badan Litbangkes Kemkes RI
7. Bu Ginah dan Agus Awalludin Angkat selaku PA penelitian
8. Atasan dan teman-teman staf Puslit Ekologi, khususnya Bu Atmarita, Bu Mitri, Mba Yuni, Pak Fahrurozi, Mba Hapsari, Mba Puti, Mas Eddy, Rofi, Parmi, Mba Ika, Jerico, , Bu Sutini, Mba Evi dan Mba Sugiharti.
9. Tim Riskesdas Provinsi Lampung, khususnya Pak Yuwana dan Bu Ina

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

10. Hj. Masayu Halimah (bici), keluarga besar Mgs M. Mansur, dan keluarga besar H. Unang B. Bahar Dominoes yang telah memberikan dukungan moral.
11. Istri saya tercinta Reyna Levina Mazhardy beserta calon buah hati kami yang telah memberikan dukungan moral dan setia mendampingi saya.
12. Rekan-rekan seperjuangan selama menempuh pendidikan Magister Ilmu Biomedik, khususnya Asri, Ayi, Mikesti, Dian, Paisal, Bangkit, Armedy, Anne dan Hotma.
13. Rekan-rekan Balitbang Depkes RI Program PADI.
14. Ikhlasul Amal dan Erik Idrus terima kasih atas kiriman jurnalnya. Mudah-mudahan cepat balik ke tanah air dengan membawa gelar PhD.
15. Seluruh guru sekolah saya yang telah memberikan pelita ilmu sampai sekarang ini.
16. Ustadz-ustadz yang telah mengajarkan nilai-nilai agama dan kebaikan sejak saya kecil.
17. Seluruh teman sekolah dan teman sepermainan sejak saya kecil.
18. Teman-teman Facebooker yang telah memberikan semangat.

Akhir kata saya berharap agar Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, Juni 2010

Penulis

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama	: Masagus Zainuri
NPM	: 0806476803
Program Studi	: Ilmu Biomedik
Departemen	: Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas	: Kedokteran
Jenis karya	: Tesis

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

Aktivitas spesifik enzim *manganese superoxide dismutase*, katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik : Hubungannya dengan kerusakan oksidatif.

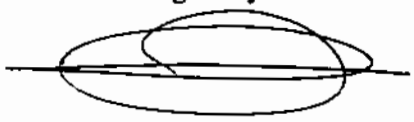
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencamtumkan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

Demikan pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 7 juni 2010

Yang menyatakan



Masagus Zainuri

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

ABSTRAK

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

ABSTRACT

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Pertanyaan Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Kerangka Teori	5
1.6 Kerangka Konsep	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hipoksia	7
2.2 Stres Oksidatif	8
2.2.1 Radikal Bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS)	8
2.2.2 Antioksidan	12
2.3 *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD)	14
2.4 Katalase	16
2.5 Enzim Glutamat Piruvat Transaminase	17
2.6 Hati	19
2.6.1 Struktur Hati	20

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

4.6 Kadar MDA dan karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 41
4.7 Aktivitas spesifik MnSOD dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik..... 42
4.8 Aktivitas spesifik katalase dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik..... 44
4.9 Aktivitas spesifik GPT dan kerusakan oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 45
4.10. Aktivitas spesifik MnSOD dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 47

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... 50
5.1 Kesimpulan..... 50
5.2 Saran..... 51
DAFTAR PUSTAKA..... 52

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

DAFTAR GAMBAR

Hal

Gambar 2.1 Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil 12

Gambar 2.2 Peran antioksidan endogen 14

Gambar 2.3 Situs aktif MnSOD 16

Gambar 2.4 Struktur katalase 17

Gambar 2.5 Struktur glutamat piruvat transaminasel 18

Gambar 2.6 Kerja enzim GPT 19

Gambar 2.7 Struktur mikroskopik jaringan hati 20

Gambar 4.1 Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 35

Gambar 4.2 Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 36

Gambar 4.3 Aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 37

Gambar 4.4 Kadar MDA pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 39

Gambar 4.5 Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap senyawa karbonil pada hati tikus 40

Gambar 4.6 Kadar MDA dan karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 41

Gambar 4.7 Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 42

Gambar 4.8 Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 42

Gambar 4.9 Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 44

Gambar 4.10. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 44

Gambar 4.11 Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik 45

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

DAFTAR TABEL

Hal

Tabel 3.1 Komposisi reagen untuk pengukuran aktivitas MnSOD 28

Tabel 3.2 Cara kerja pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase..... 29

Tabel 3.3 Komposisi larutan standar untuk pengukuran kurva standar MDA .. 31

Tabel 3.4 Cara kerja pemeriksaan senyawa karbonil 33

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

DAFTAR SINGKATAN

AGEs	*advanced glycation end-products*
BSA	*bovine serum albumin*
Cu/ZnSOD	*copper-zinc superoxide dismutase*
DNA	*deoxyribose nucleic acid*
DNPH	*dinitrophenylhydrazine*
EC-SOD	*extracelullar superoxide dismutase*
EPO	*erythropoietin*
GPT	*glutamate pyruvate transaminase*
HIF-1	*hypoxia inducible factor-1*
HREs	*hypoxia responsive element*
MDA	*malondialdehyde*
MnSOD	*manganese superoxide dismutase*
NADPH	*nicotinamide dinucleotida phosphate hydrogen*
PBS	*phosphate buffer saline*
PMSF	*phenyl methane sulfonyl fluoride*
PUFA	*polyunsaturated fatty acids*
RNS	*reactive nitrogen species*
ROS	*reactive oxygen species*
SOD	*superoxide dismutase*
TBA	*thiobarbituric acid*
TCA	*trichloro acetic acid*
TEP	*tetra ethoxy propane*
VGEF	*vascular endothelial growth factor*

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

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

ROS terdiri dari radikal (superoksida, radikal hidroksil, alkoxyl, dan peroxyl) dan non radikal (hidrogen peroksida dan hipoklorida).[4] Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar sehingga bersifat tidak stabil. Radikal bebas berusaha tetap menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel.[4,5] Jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel.[6]

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Superoxide dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Pada sel eukariotik terdapat tiga isoform SOD yaitu *copper-zinc superoxide dismutase* (Cu/ZnSOD), SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan *manganese superoxide dismutase* (MnSOD). MnSOD adalah enzim homotetramer yang mengikat satu ion Mn per subunit. MnSOD terdapat banyak pada mitokondria, oleh karena itu jumlahnya pada suatu jaringan tergantung banyak tidaknya mitokondria pada jaringan tersebut. Pada eritrosit mamalia dimana tidak terdapat mitokondria, tidak ditemukan MnSOD, sedangkan pada hati tikus aktivitas MnSOD merupakan 10% aktivitas total SOD. Aktivitas MnSOD berbeda pada berbagai macam organ dan dipengaruhi oleh beberapa keadaan misalnya hipoksia. Jumlah relatif MnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya. Penelitian yang dilakukan di laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia melaporkan bahwa sel jantung, otak, dan darah mempunyai pola ekspresi gen dan aktivitas MnSOD yang berbeda pada kondisi hipoksia sistemik kronis. Hal ini menggambarkan respon jaringan yang berbeda-beda.[9] H_2O_2 yang dihasilkan oleh MnSOD akan diuraikan menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim katalase. Pada hewan, katalase terdapat pada semua organ, khususnya di hati.[10]

Hati adalah organ metabolik terbesar dan terpenting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama (karbohidrat, lemak, protein), detoksifikasi atau degradasi zat-zat sisa, sintesis berbagai protein plasma dan penyimpanan glikogen.[11] Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenus). Gradien oksigen ini makin bertambah karena adanya proses metabolisme yang mengkonsumsi oksigen pada sel-sel parenkim dan membuat tekanan oksigen menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam regulasi gen yang mengkode enzim-enzim untuk metabolisme karbohidrat. Sebagai contoh , enzim-enzim glikolisis seperti piruvat

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

kinase ekspresinya menguat pada area yang kurang aerob yaitu zona perivenus, sedangkan enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan ekspresinya di zona periportal yang lebih aerob.[12]

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

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

1.2. Pertanyaan Penelitian

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

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

Tujuan khusus :

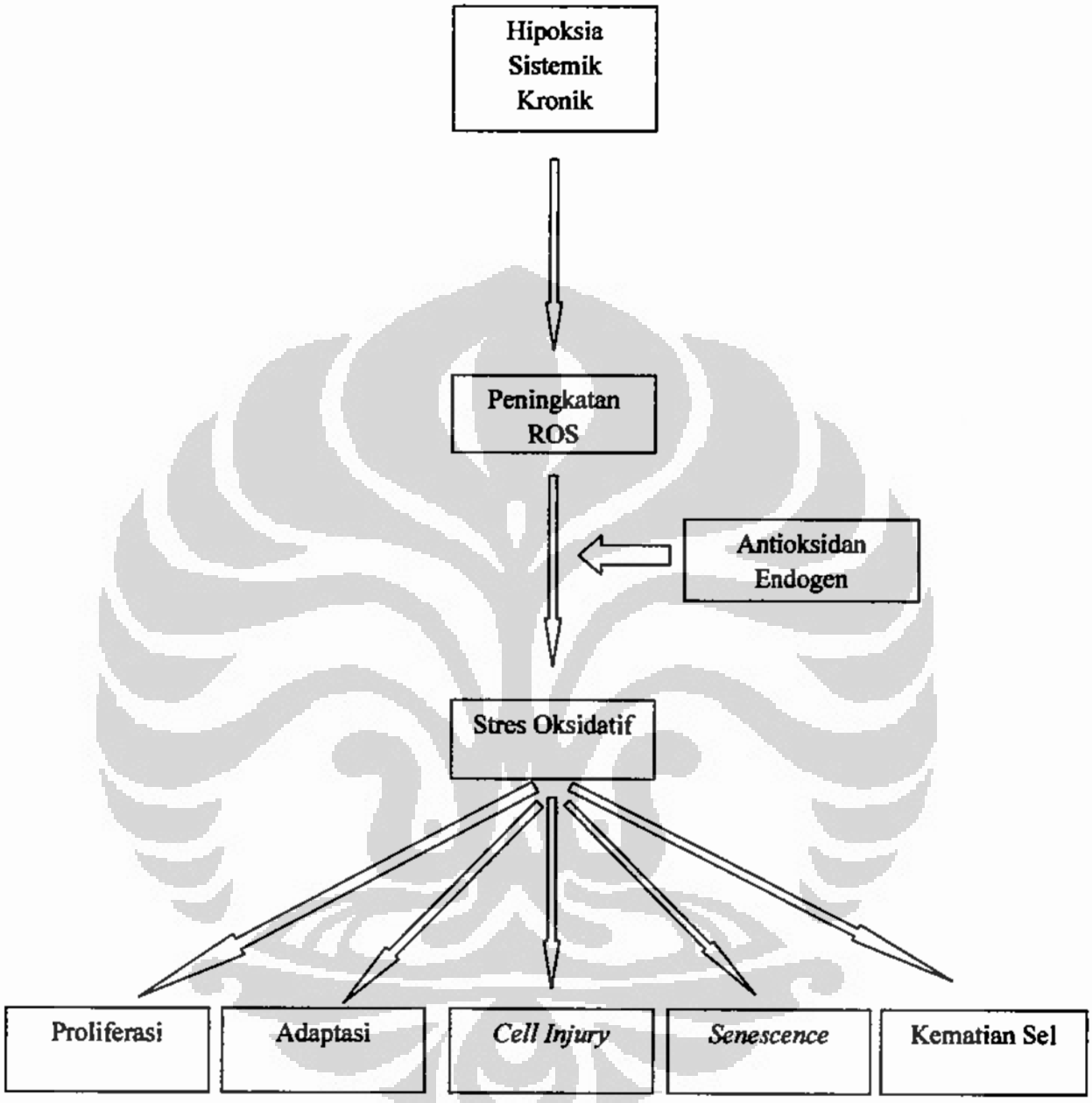
1. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar MDA pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
2. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD dan hubungannya dengan kadar karbonil pada sel hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.
3. Menentukan aktivitas spesifik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

1.4. Manfaat Penelitian

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

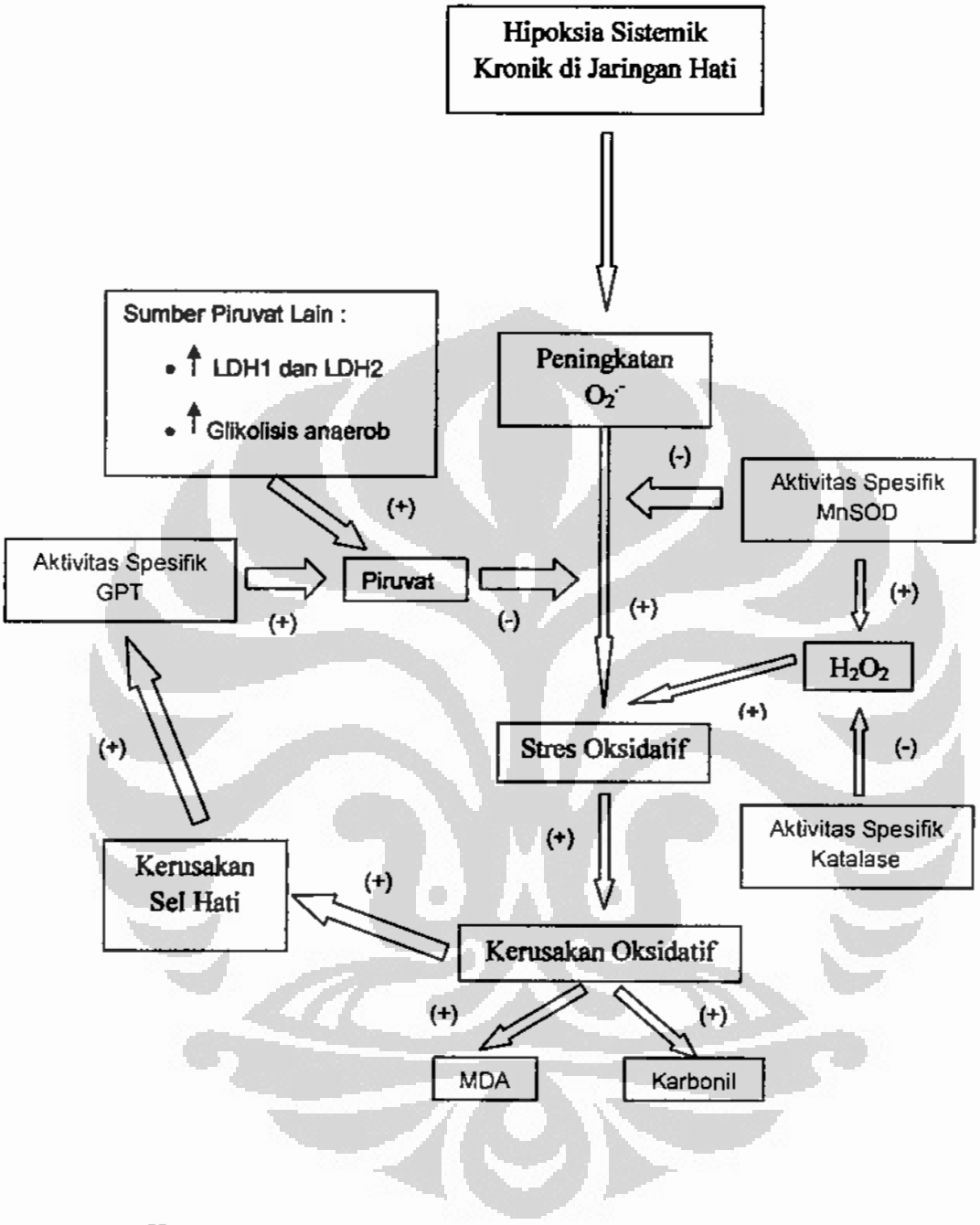
Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

1.5. Kerangka Teori



Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

I.6. Kerangka Konsep



Keterangan :

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hipoksia

Hipoksia adalah suatu keadaan dimana jumlah oksigen yang masuk tidak mencukupi untuk kebutuhan sel, jaringan atau organ sehingga menggangu fungsi biologik.[13] Hipoksia dapat menjadi cekaman lingkungan yang berat, yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel, jaringan atau organ yang bersangkutan. Kondisi hipoksia dapat terjadi selama keadaan fisiologik dan berbagai keadaan patofisiologik. Hipoksia dapat terjadi berupa hipoksia lokal atau sistemik. Hipoksia dapat disebabkan oleh berbagai faktor seperti (1) rendahnya tekanan parsial O_2 dalam darah arteri (hipoksia hipoksemik); (2) berkurangnya kapasitas hemoglobin dalam mengangkut O_2 akibat anemia (hipoksia anemik); (3) berkurangnya perfusi jaringan, baik umum maupun lokal (Hipoksia iskemik); (4) berkurangnya kemampuan jaringan menggunakan oksigen karena keracunan sel atau jaringan (hipoksia histotoksik atau sitotoksik) dan (5) gangguan difusi oksigen karena adanya aliran darah yang berlawanan dalam pembuluh kapiler (hipoksia difusi).[14]

Hipoksia dapat menyebabkan kapasitas kerja otot menjadi sangat menurun. Pada otot jantung akan menyebabkan curah jantung maksimal berkurang.[11] Tubuh sebenarnya memiliki mekanisme untuk mengatasi keadaan hipoksia. Agar dapat beradaptasi terhadap hipoksia, jaringan harus memiliki kemampuan untuk mengindera perubahan kadar O_2.[15] Oksigenasi yang optimal ke seluruh sel tubuh akan dilakukan secara fisiologis guna mempertahankan homeostasis oksigen untuk kelangsungan hidupnya.[1,2] Pada keadaan hipoksia kronis akan terjadi peningkatan sel darah merah dan pembentukan pembuluh darah baru yang akan meningkatkan kapasitas pengangkutan oksigen oleh sel darah merah[16]

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

2.2. Stres Oksidatif

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

2.2.1.Radikal Bebas dan ROS

Radikal bebas merupakan suatu molekul atau atom yang orbit terluarnya memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan senyawa yang sangat reaktif. Radikal bebas dapat menyerang senyawa atau atom di dekatnya, sehingga senyawa tersebut dapat menjadi radikal bebas juga, yang dapat menyerang senyawa berikutnya, sehingga membentuk reaksi berantai. Beberapa radikal bebas yang penting dalam tubuh merupakan derivat nitrogen yang disebut *reactive nitrogen species* (RNS) dan derivat oksigen yang sering disebut ROS. ROS bisa terdapat dalam bentuk $O_2^{\cdot-}$, radikal hidroksil ($OH^{\cdot}$), asam hipoklorit (HOCl), H_2O_2, radikal alkoksil dan radikal peroksil.[19]

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \text{ (Reaksi Fenton)}$$

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \xrightarrow{H^+} O_2 + H_2O + OH^{\cdot} \text{ (Reaksi Haber-Weiss)}$$

$O_2^{\cdot-}$ dapat terbentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh ion metal dan xantin oksidase.[19]

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$$

$$O_2 + \text{hipoxantin} \rightarrow O_2^{\cdot-} + \text{xantin}$$

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Tahap pertama dari proses peroksidasi lipid adalah inisiasi. Pada tahap ini, radikal bebas akan menginisiasi peroksidasi lipid. $OH^{\cdot}$ dapat menarik hidrogen dari PUFA (LH) sehingga dihasilkan radikal lipid ($L^{\cdot}$).

$$LH + {}^{\cdot}OH \rightarrow L^{\cdot} + H_2O$$

Tahap kedua dari proses peroksiadasi lipid adalah propagasi/pengembangan. Pada tahap propagasi terjadi dengan penambahan O_2 sehingga dihasilkan peroksi lipid ($LOO^{\cdot}$). $LOO^{\cdot}$ akan bereaksi dengan LH yang lain membentuk $L^{\cdot}$ dan LOOH (peroksida lipid). Hal ini akan menyebabkan reaksi rantai peroksidasi lipid terus berlanjut.

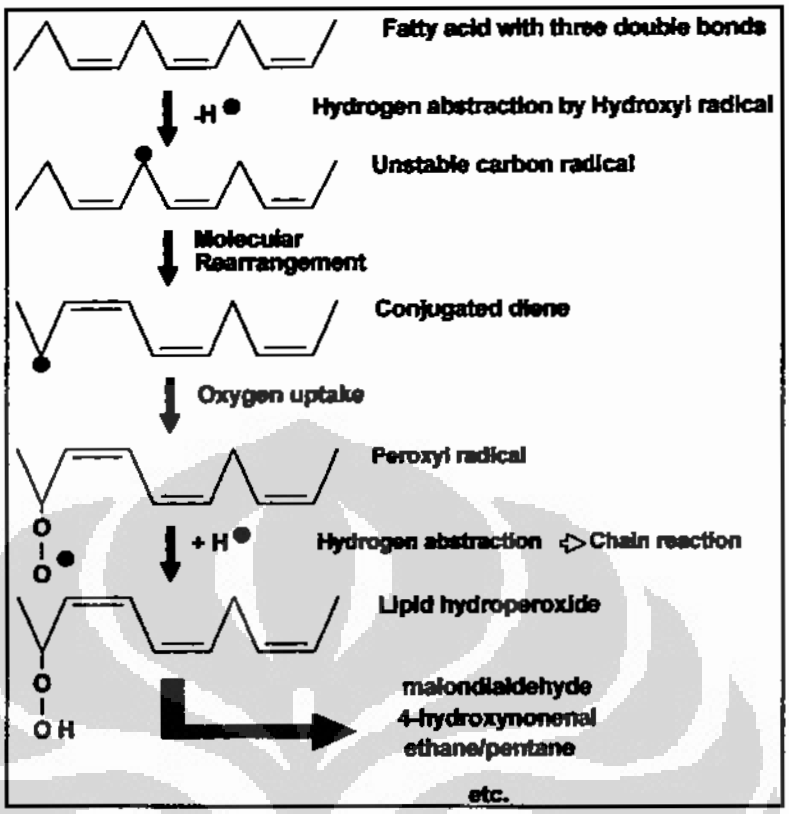
$$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$$
$$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

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

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

$$LOO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow LOOH + LH$$

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010



Gambar 2.1. Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil. [20]

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

2.2.2. Antioksidan

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

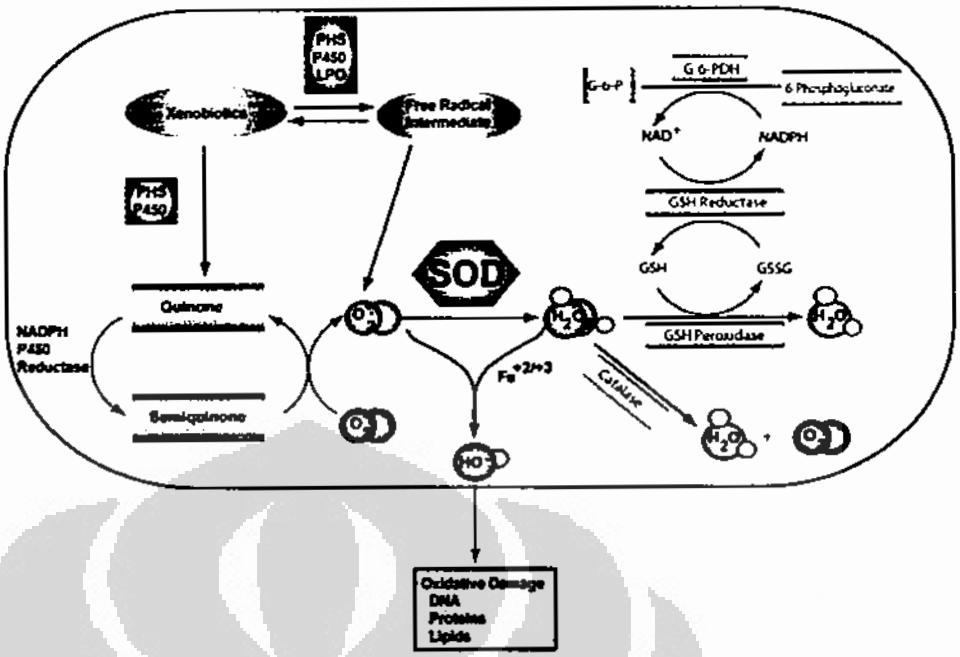
pembentukan radikal bebas, seperti *mitochondria uncoupling protein.* salah satu yang termasuk dalam kategori ini adalah protein yang mengurangi avaibilitas terhadap prooksidan, contohnya adalah transferin, albumin, haptoglobin, haemopeksin, haem oxygenases, metallothionein dan polyamines. Selain itu, juga terdapat protein yang mengoksidasi ion Fe^{2+}, seperti ceruloplasmin. Sistem pertahanan antioksidan lain dapat berupa *sacrificial agent* yang secara utama dioksidasi oleh radikal bebas untuk menjaga biomolekul yang lebih penting, seperti glutation (GSH), α-tokoferol, bilirubin, askorbat, albumin, dan plasmalogen.[10]

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010



Gambar 2.2. Peran antioksidan endogen.[22]

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

2.3. *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD)

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

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

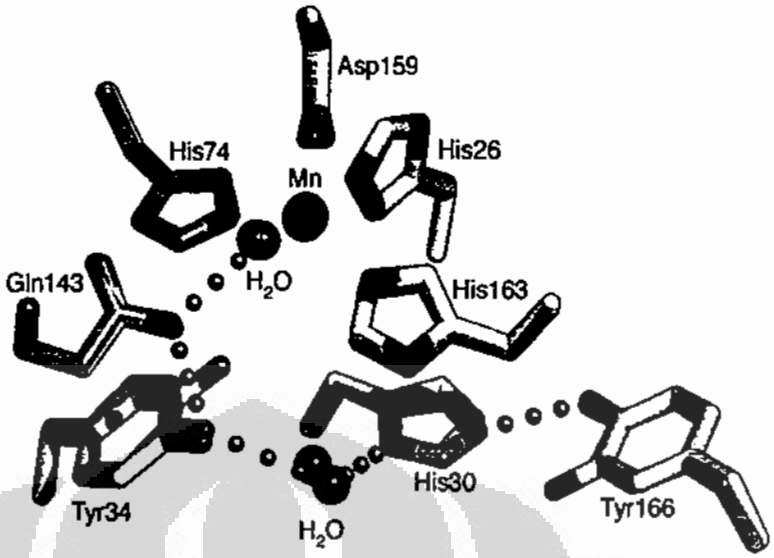
Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

Gen MnSOD terletak di kromosom 6 (6q25.3) merupakan *single copy* yang terdiri dari 5 ekson dan 4 intron. Induksi dari gen ini dipengaruhi oleh karakteristik yang unik yakni promoter mengandung sedikit TATA dan memiliki elemen enhancer intron. Ekspresi gen diatur oleh promoter yang kaya sekuens guanin dan sitosin yang mengandung situs pengikatan protein spesifik 1 (PS1).[24,25,26] Aktivitas MnSOD akan meningkat pada keadaan terbentuk $O_2^{\cdot}$ yang tinggi (*inducible enzyme*).[27]

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010



Gambar 2.3 Situs aktif MnSOD. [29]

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

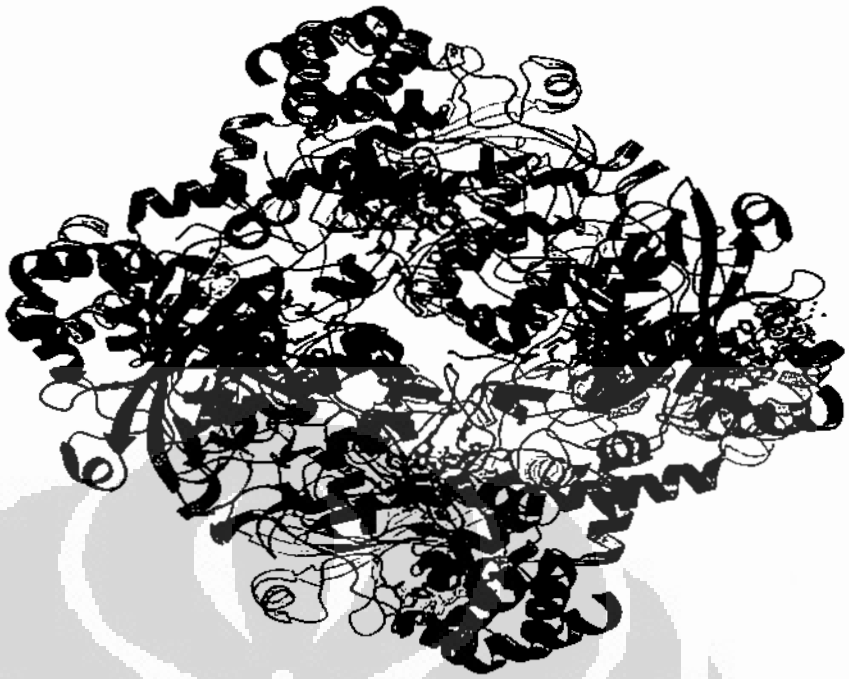
$$Mn^{3+}(OH)SOD + O_2^{\cdot-} + H^+ \xrightarrow{K1} Mn^{2+}(H_2O)SOD + O_2$$

$$Mn^{2+}(H_2O)SOD + O_2^{\cdot-} + H^+ \xrightarrow{K2} Mn^{3+}(OH)SOD + H_2O_2$$

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

2.4. Katalase. [10]

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



Gambar 2.4. Struktur katalase.[31]

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

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

2.5. Enzim Glutamat Piruvat Transaminase (GPT)

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

Gambar 2.5. Struktur glutamat piruvat transaminase.[32]

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Glutamat piruvat transaminase atau alanin transferase dapat mengkatalisis reaksi pemindahan gugus amino (-NH_2) dari asam amino alanin ke asam amino α-ketoglutarat menghasilkan asam piruvat dan glutamat.

Gambar 2.6. Kerja enzim GPT.[33]

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

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

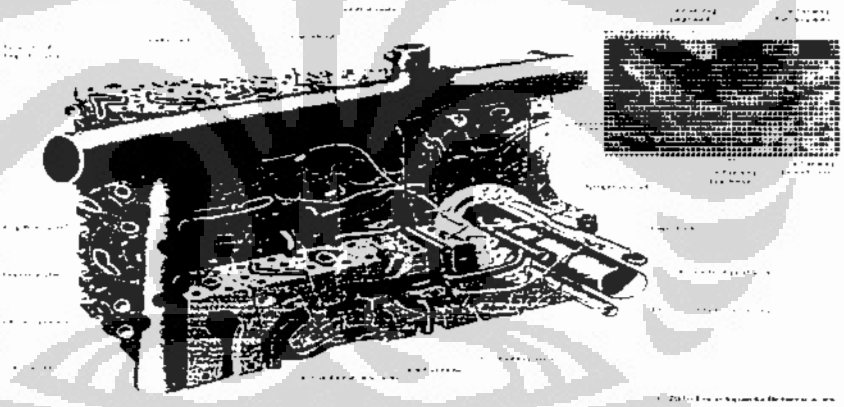
2.6. Hati.[36]

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

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

2.6.1. Struktur Hati.[36]

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



Gambar 2.7. Struktur mikroskopik jaringan hati.[37]

2.6.1.1. Stroma

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

2.6.1.2. Lobulus Hati

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

2.6.2. Aliran darah hati

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

portalis, sehingga sel-sel ini yang pertama dipengaruhi oleh perubahan darah yang masuk. Zona 3 terletak disekeliling v.hepatika dan zona dua diantaranya. Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenus). Gradien oksigen ini makin bertambah karena adanya proses metabolisme yang mengkonsumsi oksigen pada sel-sel parenkim dan membuat tekanan oksigen menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam regulasi gen yang mengkode enzim-enzim untuk metabolisme karbohidrat. Sebagai contoh , enzim-enzim glikolisis seperti piruvat kinase ekspresinya menguat pada area yang kurang aerob yaitu zona perivenus, sedangkan enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan ekspresinya di zona periportal yang lebih aerob.[12]

2.6.3. Fungsi Hati.[36]

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

a. Sintesis protein plasma

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

b. Sekresi empedu

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

c. Penyimpanan Metabolit

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

d. Fungsi metabolik

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

e. Detoksifikasi dan inaktivasi

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

BAB III
METODE PENELITIAN

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

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

Adanya hipoksia yang terjadi, ditunjukkan dengan penurunan bertahap pO_2 dan pCO2 darah tikus, serta penurunan hematokrit yang merupakan tanda berkurangnya jumlah sel darah merah didalam darah.[38]

3.1. Desain Penelitian

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

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.3. Sampel Penelitian

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

Dua puluh lima hati tikus ini dibagi menjadi 5 kelompok :

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

3.4. Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel penelitian ditentukan berdasarkan rumus Federer:

$\{(t-1)(n-1)\} \geq 1$ t = jumlah kelompok perlakuan = 5
$\{(5-1)(n-1)\} \geq 15$ n= jumlah sampel pada masing-masing kelompok
$n \geq 5$ perlakuan

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

3.5. Bahan dan Alat Penelitian

3.5.1. Bahan Penelitian

- Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD : Kit RanSOD® (Randox).
- Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas spesifik GPT : Kit GPTST (ST Reagensia).
- Standar MDA , TCA *(trichloro acetic acid)* , TBA (*tiobarbituric acid)*
- H_2O_2
- Guanidin, DNPH, HCL, etanol, etil asetat
- NaCN (Natrium Sianida)
- *Nuclei lysis solution*
- PMSF *(Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride)*
- Aquabidest
- PBS *(Phosphat Buffer Saline)*
- Buffer fosfat

3.5.2. Alat Penelitian

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

3.6. Cara Kerja

3.6.1. Penimbangan Hati

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

3.6.2. Pembuatan Homogenat hati

Untuk pemeriksaan MDA, senyawa karbonil, GPT dan katalase, jaringan hati dilumatkan dengan *micropestle* dan *homogenizer* dalam 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7.0 dan PMSF, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD, jaringan hati dilumatkan dengan menggunakan *micropestle* dan *homogenizer* dalam 50 µl *nuclei lysis solution* dan PMSF. Homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang dalam tabung yang bersih dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

3.6.3. Pemeriksaan aktifitas spesifik enzim MnSOD

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD digunakan homogenat jaringan hati (50 mg), jaringan kemudian dilumatkan dalam 500 µL *nuclei lysis solution* dan PMSF, homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang dalam tabung yang bersih dan digunakan untuk pengukuran aktivitas MnSOD. Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia yaitu dengan menggunakan kit RanSOD®. Prinsip pemeriksaan MnSOD dengan menggunakan kit ini adalah pengukuran besarnya inhibisi pembentukan radikal $O_2^{\cdot-}$ oleh MnSOD. Xantin oleh enzim xantin oksidase akan diubah menjadi asam urat dan

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

menghasilkan radikal superoksida. Radikal ini akan bereaksi dengan *2-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride* (I.N.T) membentuk warna merah formazan. Aktivitas SOD total ditetapkan dari derajat penghambatan pembentukan warna formazan ini yang diukur dengan spektrofotometer λ505 nm. Reagen-reagen pada kit ini terdiri dari mixed substrate yang mengandung xantin, buffer fosfat, xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar. Sebanyak 25μL sampel/standar dimasukan ke dalam kuvet, lalu ditambahkan *mixed substrate* dan campur dengan baik. Untuk menghambat Cu/ZnSOD, sebanyak 5μL natrium sianida 5 mM ditambahkan ke dalam campuran tersebut dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan enzim xantin oksidase dan serapan cahaya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detikpertama setelah penambahan enzim (A_1) dan 3 menit kemudian (A_2).

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

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

Perhitungan

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ sampel/mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/mnt})}$$

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

3.6.4. Pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase

Pemeriksaan aktivitas katalase dilakukan dengan menggunakan metode Mates. Optimasi dilakukan terlebih dahulu sebelum pemeriksaan sampel. Dari hasil optimasi pengenceran sampel optimum adalah 500X, dan waktu optimum adalah pada saat menit ke 2. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 210 nm, setelah blangko atau sampel uji dicampur dengan H_2O_2 reaksi akan berjalan, t_0 adalah 30 detik setelah pencampuran, t_1 adalah 1 menit setelah t_0, dan seterusnya.

Tabel 3.2. Cara kerja pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase

Kuvet	Blanko	Uji
Sampel	-	50µL
Dapar fosfat	50µL	-
H_2O_2 (1: 4000)	950µL	950µL
Reaksi berjalan setelah penambahan H_2O_2 pada tabung uji dan Blangko, serapan diikuti selama 10 menit dan dicatat serapannya pada panjang gelombang 210 nm setiap 1 menit		

3.6.5. Pemeriksaan aktivitas spesifik enzim GPT

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

$$\text{L-Alanin + 2-Oksoglutarat} \xrightarrow[\text{LDH}]{\text{GPT}} \text{Piruvat + L-Glutamat}$$

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{L-Laktat} + \text{NAD}$$

$$\text{Sampel Piruvat} + \text{NADH} \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{L-Laktat} + \text{NAD}$$

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

Perhitungan

$$\Delta A/\text{menit} = \frac{\frac{(\Delta A1 - \Delta A2) + (\Delta A2 - \Delta A3)}{10}}{2}$$

Aktifitas GPT IU/L = (ΔA/menit X 1746*)

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

3.6.6. Pemeriksaan kadar MDA

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan TCA pada suhu 97^{0}C akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang akan memberikan serapan pada panjang gelombang 530 nm. Jumlah MDA yang terbentuk akan menggambarkan proses peroksidasi lipid.

Pembuatan Kurva Standar MDA

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Tabel 3.3. Komposisi larutan standar untuk pengukuran kurva standar MDA

	Blanko	[0.125]	[0,3125]	[0,625]	[1,25]	[2,5]	[5]
Std	0	1	2,5	5	10	20	40
H_2O (µL)	400	399	397,5	395	390	380	360
Total (µL)	400	400	400	400	400	400	400

400 µL standar + 200 µL TCA 20% ⟶ (tab 1,5 mL)

↓

Vortex perlahan

↓

400 µL TBA 0,67%

↓

Vortex

↓

Inkubasi dalam penangas air 96^{0}C 10 menit (> 15 menit)

↓

Rendam dalam air dingin

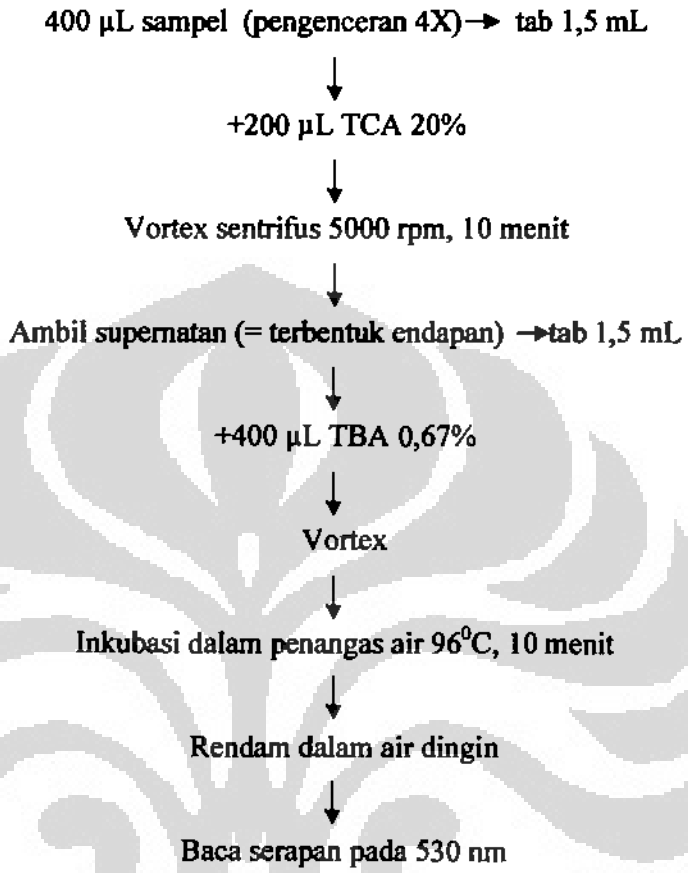
↓

Baca serapan pada 530 nm

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Pengukuran Sampel

Sampel : diencerkan 4X (100 µL sampel + 300 µL H_2O)



Perhitungan kadar MDA

$X = \frac{Y-a}{B}$

Keterangan : X = kadar MDA

Y= serapan

a = *slope*

b = *intercept*

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

3.6.7. Pemeriksaan Kadar Karbonil

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

Tabel 3.4. Cara kerja pemeriksaan senyawa karbonil

Bahan	Uji	Kontrol
Sampel	100 µL	100 µL
DNPH	400 µL	-
HCL 2,5 M	-	400 µL
Inkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam, vorteks setiap 15 menit		
TCA 20%	500 µL	500 µL
Vorteks, inkubasi dalam es selama 5 menit, sentrifus 10.000g, 4^0C, 10 menit		
Buang supernatan, resuspend pelet dengan 500 µL TCA 10%		
inkubasi di es 5 menit, sentrifus 10.000g, 4^0C, 10 menit		
Buang supernatan, resuspend pelet dengan 500 µL etanol : etil asetat (1:1), sentrifus 10.000g, 4^0C, 10 menit, ulangi 3 kali		
Resuspend pelet dengan 250 µL guanidin, vorteks, sentrifus 10.000g, 4^0C, 10 menit		
Ambil supernatan dan ukur serapan dengan spektrofotometer pada λ370		

Protein karbonil dihitung dengan menggunakan rumus :

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

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

3.6.8. Pengukuran Kadar Protein

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

3.7. Analisis Uji Statistik

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

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

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

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

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

Menurunnya aktivitas MnSOD pada hipoksia 1 dan 7 hari diduga disebabkan karena peningkatan produksi $O_2^{\cdot-}$ yang berlebihan sebagai substrat

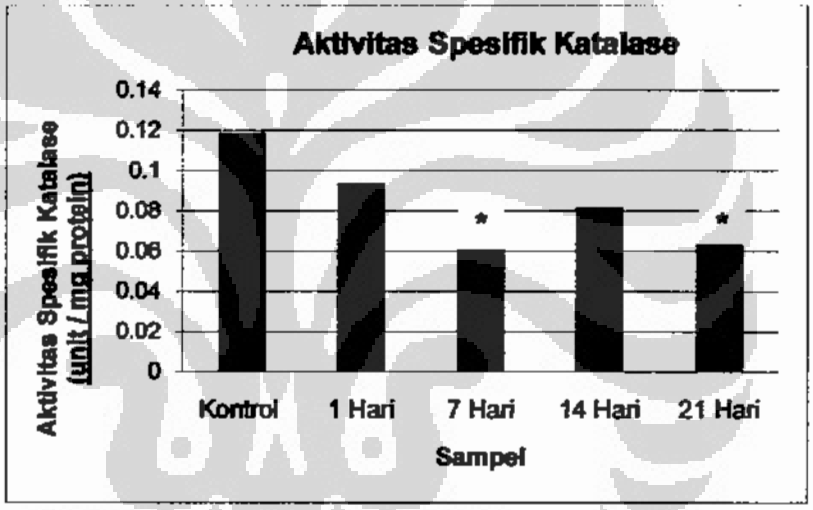
Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

MnSOD, sehingga diduga mengakibatkan enzim MnSOD menjadi jenuh dan tidak dapat lagi mengikat substrat pada saat pemeriksaan.

Peningkatan aktivitas MnSOD pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari diduga karena terjadi proses adaptasi dari sel hati terhadap hipoksia, dimana selain MnSOD, terdapat berbagai sistem pertahanan antioksidan lain dari sel, yang dapat membantu menekan produksi ROS. Hal ini menyebabkan MnSOD menjadi tidak jenuh dan terlihat meningkat aktivitasnya saat pemeriksaan.

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

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



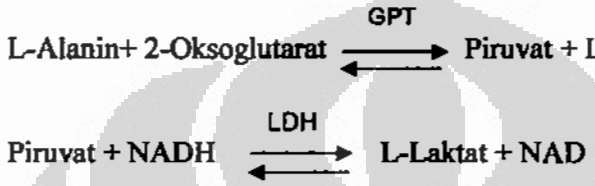
Gambar 4.2. Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p<0.05$)

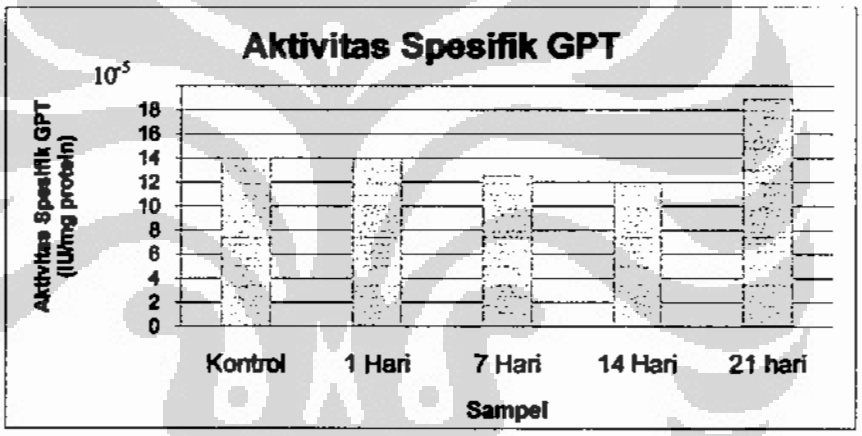
Aktivitas spesifik enzim katalase secara keseluruhan mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kontrol. Pada tikus hipoksia 7 dan 21 hari, penurunan aktivitas enzim katalase secara statistik bermakna bila dibandingkan dengan kontrol dengan nilai $p= 0.038$ dan $p= 0.001$. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Putri di bagian Biokima dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran UI melaporkan bahwa pada kondisi hipoksia hipobarik terjadi penurunan aktivitas katalase pada hati tikus.[40] Studi yang dilakukan Martin melaporkan bahwa pada hipoksia hipobarik dapat menyebabkan penurunan

bermakna ekspresi mRNA enzim-enzim antioksidan yang ada di hati, termasuk katalase.[41]

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

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





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

Hasil pemeriksaan aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia ditunjukkan oleh gambar diatas. Secara umum tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas spesifik enzim GPT pada kelompok uji bila dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas GPT cenderung mengalami sedikit penurunan pada kondisi hipoksia 1, 7, dan 14 hari. Pada hipoksia 21 hari terjadi peningkatan aktivitas GPT, rata-rata aktivitas GPT pada tikus yang diinduksi hipoksia 21 hari sebesar $19{,}01 \times 10^{-5}$ IU/mg protein, sedangkan rata-rata aktivitas GPT pada hati tikus kontrol sebesar $14{,}04 \times 10^{-5}$ IU/mg protein, namun peningkatan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0.061$).

Penurunan aktivitas GPT pada kondisi hipoksia 1 sampai 14 hari menunjukkan adanya kerusakan hati, namun kerusakan ini tidak terlalu berat karena tingginya kadar antioksidan yang terdapat pada sel hati. Penelitian yang dilakukan Jusman di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia menyebutkan bahwa kerusakan pada jaringan hati meningkat seiring dengan adanya hipoksia, akan tetapi masih dalam batas kerusakan sedang.[42]

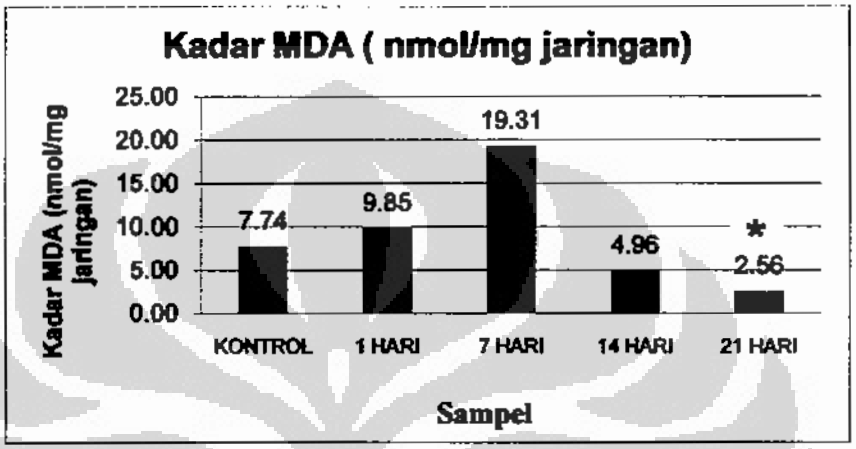
Enzim GPT mengkatalisis reaksi perubahan alanin menjadi piruvat. Peningkatan aktivitas enzim GPT pada hipoksia 21 hari diduga karena diperlukannya piruvat dalam metabolisme anaerob. Piruvat dapat masuk ke jalur glukoneogenesis untuk membentuk glukosa, kemudian glukosa akan mengalami proses glikolisis anaerob yang akan menghasilkan ATP. Hasil ini sesuai dengan penelitian Evendi yang melaporkan terjadi peningkatan ekspresi isozim LDH1 dan LDH2 selama keadaan hipoksia. Dimana diketahui bahwa isozim LDH1 dan LDH2 berperan mengubah laktat menjadi piruvat.[43] Sebab lain dari pembentukan piruvat, diduga piruvat yang terbentuk diubah menjadi glukosa 6-fosfat yang selanjutnya akan masuk kedalam jalur *HMP shunt*. *HMP shunt* berperan menghasilkan NADPH yang dibutuhkan untuk proses reduksi GSSG menjadi GSH, dimana GSH berperan sebagai antioksidan.

Penelitian lain menyebutkan peran piruvat sebagai antioksidan dengan menghambat kerja NADH oksidase. Seperti diketahui sebelumnya NADH oksidase adalah sumber utama dari terbentuknya superoksida. Akibat penghambatan pembentukan $O_2^{\cdot-}$ oleh piruvat, maka akan terjadi penghambatan pada proses peroksidasi lipid dan pembentukan senyawa karbonil. [44] Penelitian yang dilakukan Roudier dkk melaporkan babwa piruvat dapat mengurangi kerusakan DNA selama terjadinya hipoksia pada karsinoma sel hati.[34] Lee dkk melaporkan dalam penelitiannya bahwa etil piruvat, suatu senyawa piruvat yang mengalami modifikasi agar lebih stabil dalam larutan, secara bermakna dapat menuruukan kadar MDA dan senyawa NO yang terbentuk pada jantung dan hati tikus yang diintoksikasi dengan paraquat.[35]

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

4.4. Kadar MDA hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan TCA pada suhu 96^0C akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang akan memberikan serapan pada panjang gelombang 530 nm.



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

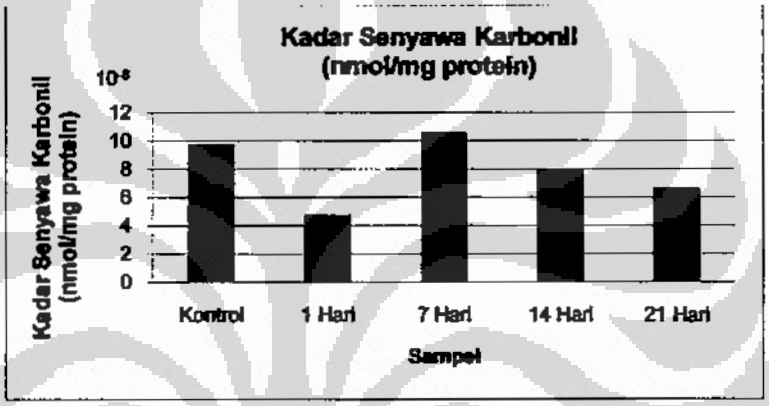
Dari gambar 4.4 terlihat kenaikan kadar MDA sampai Hipoksia hari ke-7, kemudian mengalami penurunan sampai hipoksia 21 hari. Kadar MDA pada tikus hipoksia 7 hari tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol (p= 0,06) sedangkan penurunan kadar MDA pada tikus hipoksia 21 hari berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol (p= 0,045). Hipoksia akan menyebabkan peningkatan kadar ROS. Pembentukan ROS yang berlebihan dapat melampaui kemampuan netralisir dari antioksidan. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya kerusakan oksidatif yang menyebabkan kerusakan berbagai makromolekul dalam sel. Peningkatan kadar MDA menunjukkan meningkatnya stres oksidatif akibat terjadinya hipoksia. Penelitian yang dilakukan Halim menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.[12]

Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA. Pada kondisi ini diduga telah terjadi perubahan regulasi pertahanan terhadap stres

oksidatif yang terjadi pada jaringan hati. Kemungkinan lain adalah terbatasnya kadar oksigen pada sel menyebabkan berkurangnya propagasi pada proses pembentukan MDA, sehingga MDA yang dihasilkan hanya berasal dari ROS yang terbentuk akibat hipoksia.

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

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

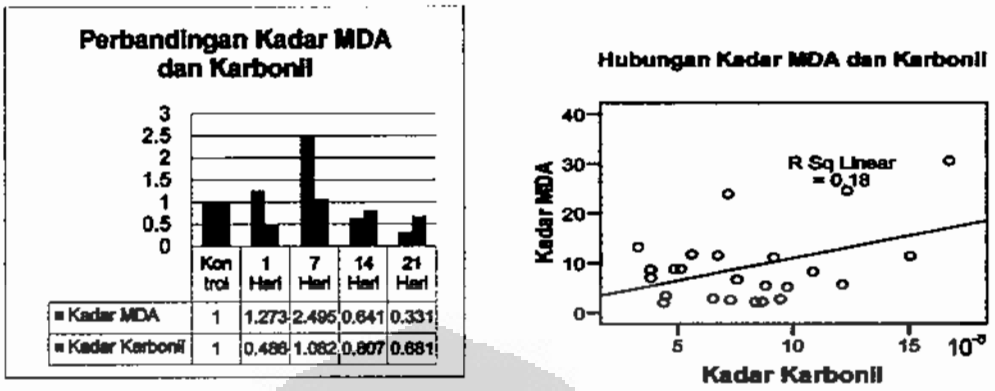


Gambar 4.5. Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 hari dan 21 hari

Dari gambar diatas terlihat secara keseluruhan kadar senyawa karbonil yang cenderung menurun dengan bertambahnya hipoksia, namun penurunan ini secara statistik tidak bermakna ($p>0.05$) . Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat adanya $O_2^{\cdot-}$ dan MDA. $O_2^{\cdot-}$ yang terbentuk pada keadaan hipoksia dapat mengalami protonasi menjadi $OH^{\cdot}$, dimana $OH^{\cdot}$ jauh lebih bersifat reaktif bila dibandingkan $O_2^{\cdot-}$. Pada pH fisiologis terjadi keseimbangan antara jumlah $O_2^{\cdot-}$ dan $OH^{\cdot}$, namun pada permukan membran dimana pH nya lebih sedikit asam, akan terjadi protonasi dari $O_2^{\cdot-}$ menjadi $OH^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$ dapat menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid membran dan menyebabkan terbentuknya MDA.[7] Penurunan kadar karbonil diduga karena banyaknya konversi $O_2^{\cdot-}$ menjadi $OH^{\cdot}$, namun pembentukan senyawa karbonil oleh MDA belum terjadi.

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

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



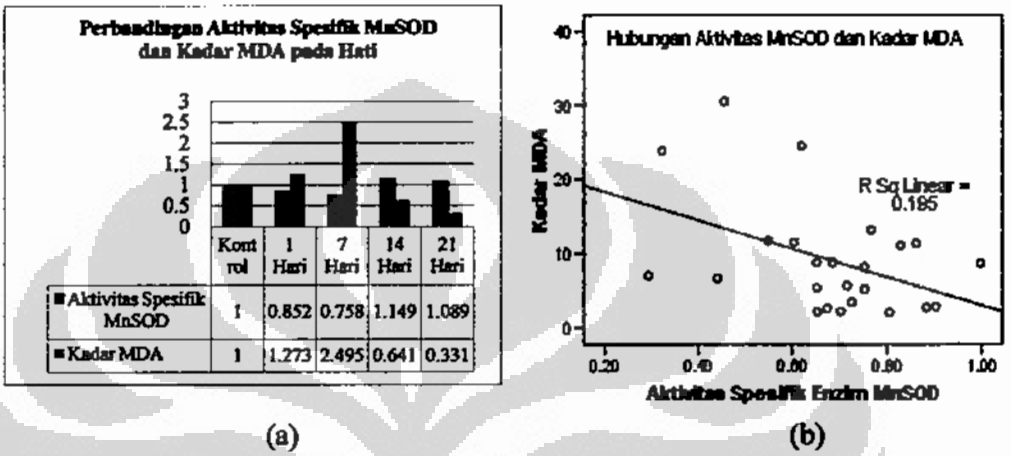
Gambar 4.6. Kadar MDA dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan kadar MDA dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b)Hubungan antara kadar MDA dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan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

Dari gambar diatas, terlihat secara keseluruhan pola diagram batang antara kadar MDA dan karbonil serupa. Pada hipoksia 1 dan 7 hari didapat perbandingan kadar MDA yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan produksi MDA terjadi pada tahap awal hipoksia. Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari didapat perbandingan kadar karbonil yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar MDA. Hal ini menunjukkan produksi karbonil yang terjadi pada keadaan hipoksia lanjut. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Margaret yang menyatakan pada darah penderita kanker paru yang telah lanjut didapat kadar karbonil yang tinggi dan kadar MDA yang rendah,[45] sedangkan Nida melaporkan pada tikus dengan kanker payudara pasca induksi DMBA melaporkan kadar MDA plasma yang tinggi dan kadar karbonil plasma rendah.[46] Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang positif sedang antara kadar MDA dan karbonil. Hubungan yang positif menunjukkan kenaikan kadar MDA akan menyebabkan kenaikan kadar karbonil. Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat reaksi antara MDA dan protein atau reaksi oksidasi rantai samping protein oleh ROS. Hal ini yang menyebabkan hubungan yang tidak kuat antara MDA dan karbonil.

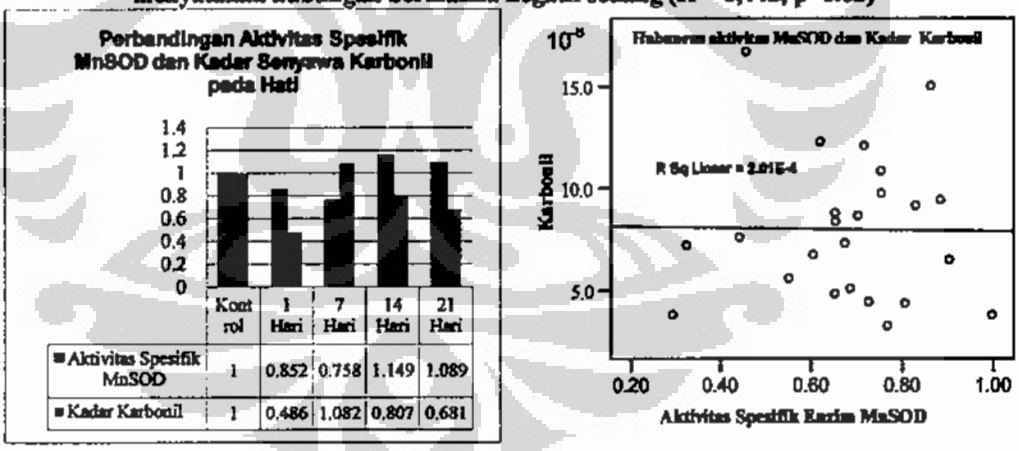
Penelitian ini mendapatkan hasil kadar MDA yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan yang

terjadi pada jaringan hati akibat hipoksia belum terlalu besar. Diduga sistem pertahanan antioksidan hati dapat mencegah kerusakan hati yang lebih lanjut. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Jusman yang menyatakan kerusakan hati sedang terjadi pada tikus hipoksia.[42]

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



Gambar 4.7. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b)Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan bermakna negatif sedang (R= -0,442, p<0.05)



Gambar 4.8. Aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b)Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,014, p>0.05)

Dari gambar 4.7. terlihat pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipoksia sistemik kronik ditemukan adanya hubungan negatif sedang antara

aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA (R = -0,442). Hubungan ini secara statistik bermakna (p =0,031). Sampai hipoksia 7 hari kadar MDA terus meningkat, hal ini menandakan keadaan stres oksidatif yang terus meningkat, disebabkan peningkatan produksi ROS. Sementara itu aktivitas spesifik MnSOD cenderung menurun sampai hipoksia 7 hari. Hal ini diduga karena produksi ROS yang terjadi sangat berlebihan. Kenaikan jumlah ROS dapat menyebabkan peningkatan proses peroksidasi lipid yang akan menyebabkan peningkatan kadar MDA. Selain itu, peningkatan ROS dapat menyebabkan enzim MnSOD menjadi jenuh, sehingga tidak mampu lagi mengikat substrat $O_2^{\cdot-}$ saat dilakukan pemeriksaan. Dewi melaporkan bahwa pada jaringan jantung dan darah, pada kondisi hipoksia 1 hari terjadi penurunan aktivitas MnSOD dan ekspresi mRNA MnSOD.[9] Hati merupakan tempat metabolisme utama, sehingga kemungkinan jumlah ROS yang terbentuk di hati akan lebih banyak dibandingkan yang terdapat dalam jantung dan darah. Diduga hal ini yang menyebabkan penurunan aktivitas MnSOD sampai hari ketujuh pada hipoksia di hati. Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas spesifik MnSOD, diduga telah terjadi perubahan pengaturan sistem pertahanan sel. Produksi ROS yang terus meningkat sejalan dengan keadaan hipoksia ditekan oleh sistem pertahanan sel yang lain, hal ini yang menyebabkan kadar MDA menurun, sementara itu enzim MnSOD menjadi tidak jenuh oleh substrat, sehingga pada saat pengukuran aktivitas spesifiknya meningkat.

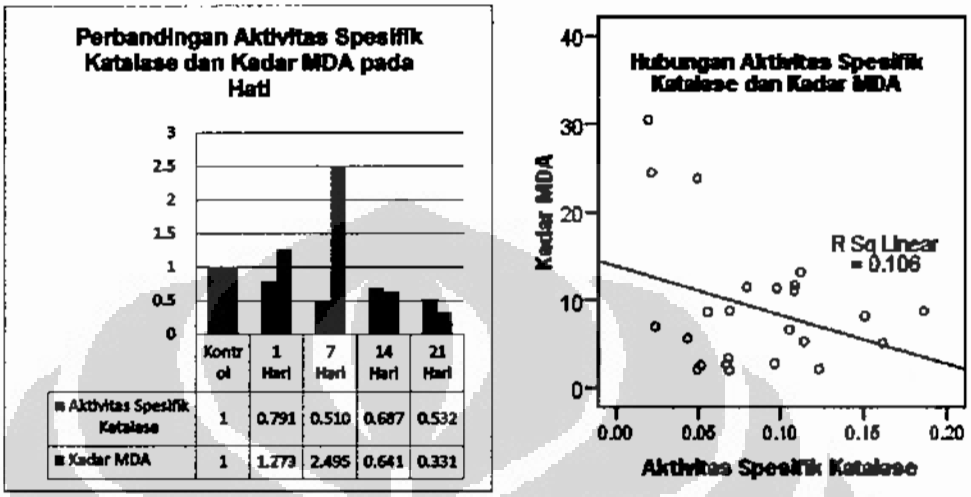
Gambar 4.8 menunjukkan *scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik. Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang negatif lemah (R = -0,014) antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar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

Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan yang lebih erat antara MDA dan MnSOD bila dibandingkan karbonil dan MnSOD. Hal ini menggambarkan keadaan sel hati yang belum mengalami kerusakan lanjut, sehingga aktivitas MnSOD lebih dimaksudkan untuk mengatasi peningkatan kadar MDA dibandingkan kadar karbonil. Secara keseluruhan dapat disimpulkan

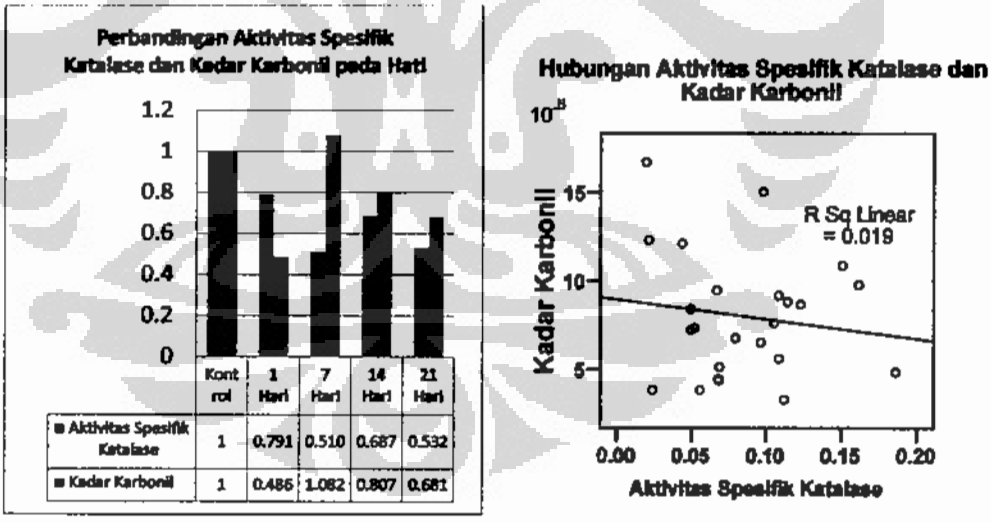
Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

bahwa enzim MnSOD berperan untuk mengatasi stres oksidatif pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

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



Gambar 4.9. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif sedang (R= -0,326, p>0.05)



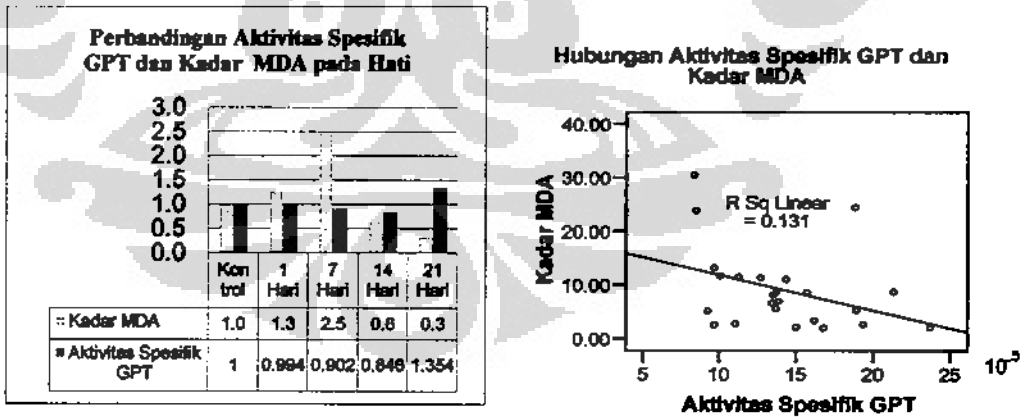
Gambar 4.10. Aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,138, p>0.05)

Dari gambar 4.9 terlihat pola yang berlawanan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Analisis korelasi pearson menyatakan terdapat hubungan negatif sedang antar keduanya (R=-0,326). Pada gambar 4.10 terlihat hasil analisis korelasi pearson antara aktivitas spesifik katalase dan kadar senyawa karbonil dimana didapatkan hubungan lemah (R=-0,138). Hal ini menunjukkan adanya peran katalase dalam menghambat pembentukan MDA dan karbonil.

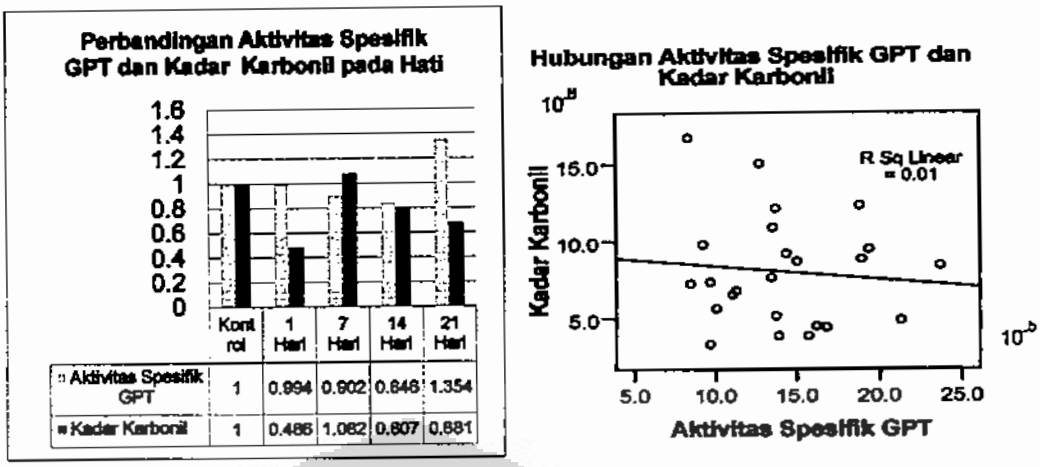
MDA merupakan hasil dari peroksidasi lipid. MDA dapat bereaksi dengan protein sehingga terbentuk senyawa karbonil. Proses peroksidasi lipid dimulai dengan pengambilan hidrogen dari PUFA oleh $OH^{\cdot}$. $OH^{\cdot}$ dapat dibentuk dari reaksi antara $O2^{\cdot-}$ dan H_2O_2. Katalase merupakan enzim yang berperan untuk mengkonversi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2. Dengan demikian katalase mencegah pembentukan $OH^{\cdot}$ dan secara tidak langsung mencegah pembentukan MDA dan karbonil.

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

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



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



Gambar 4.12. Aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari. (a) Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil setelah dinormalisasi dengan nilai kontrol. (b) Hubungan antara aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,101, p>0.05)

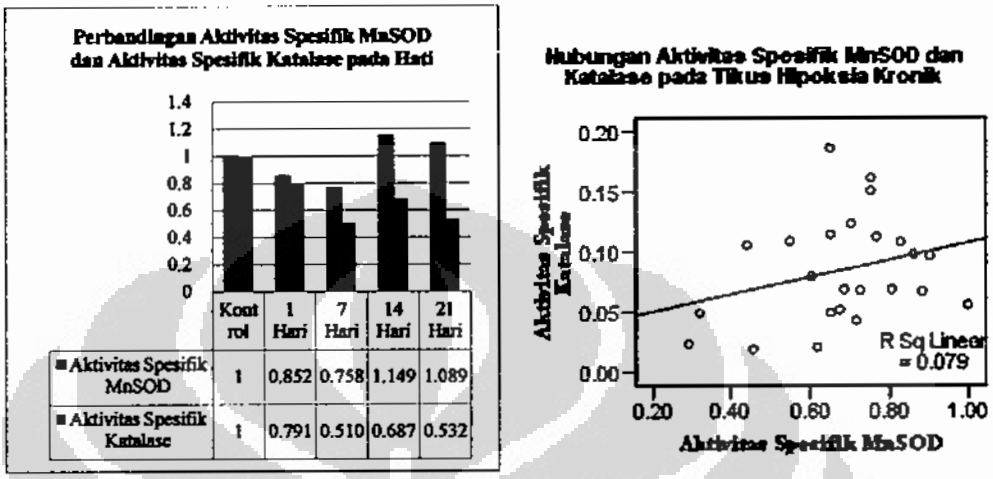
Pada gambar 4.11 terlihat pola yang saling berlawanan antara aktivitas GPT dan kadar MDA. Dari analisis korelasi pearson didapat hubungan negatif sedang (R=-0.362). Peningkatan produksi ROS akan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid membran yang akan menyebabkan peningkatan kadar MDA. Selain itu ROS akan menyebabkan modifikasi ataupun kerusakan pada struktur enzim GPT, sehingga akan menghambat aktivitasnya. Hubungan yang tidak kuat antara kadar MDA, sebagai indikator stres oksidatif, dan aktivitas GPT, diduga disebabkan letak GPT yang terdapat pada sitosol sel hati. Diketahui bahwa pada sitosol sel hati banyak terdapat antioksidan GSH yang berperan untuk menetralisir ROS.

Penelitian Halim melaporkan MDA sebagai indikator stres oksidatif meningkat sebanding dengan lamanya hipoksia, sedangkan GSH menurun dengan lamanya hipoksia. GSH sudah mengalami penurunan sejak awal hipoksia dan berlanjut sampai akhir waktu perlakuan pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan penggunaan GSH sebagai antioksidan pada jaringan hati dilakukan sejak hari pertama.[12]

Dari gambar 4.12 terlihat hubungan yang lemah antara aktivitas GPT dan kadar senyawa karbonil. Dari hasil analisis pearson didapat hubungan tidak bermakna negatif lemah antara aktivitas GPT dan kadar senyawa karbonil. Hal ini

menunjukkan kerusakan pada enzim GPT hanya sedikit sehingga tidak berpengaruh pada kadar senyawa karbonil yang terbentuk.

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



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

Enzim Katalase merupakan enzim yang berperan sebagai *scavenger* H_2O_2 yang dihasilkan oleh MnSOD menjadi O_2 dan H_2O. Adanya pola yang sama antara MnSOD dan katalase, menunjukkan bahwa katalase bekerja sejak dari hipoksia 1 hari. Dari literatur diketahui bahwa katalase bekerja pada konsentrasi H_2O_2 yang tinggi,[10] sehingga dapat disimpulkan pada kondisi hipoksia 1 hari telah terjadi produksi H_2O_2 yang tinggi oleh MnSOD. Hasil analisis statistik menunjukkan hubungan yang positif lemah. Hubungan yang positif lemah ini mungkin disebabkan ada sistem lain yang juga bekerja sebagai *scavenger* H_2O_2. Antioksidan lain yang dapat berperan sebagai *scavenger* H_2O_2 misalnya GSH. Fungsi GSH disebabkan oleh adanya gugus –SH. GSH dapat dioksidasi menjadi GSSG dan H_2O, kemudian GSSG akan direduksi kembali menjadi GSH dengan bantuan enzim glutation reduktase, enzim ini membutuhkan kofaktor NADPH, NADPH ini berasal dari *HMP Shunt*, yaitu reaksi yang dikatalisis oleh enzim

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

glukosa 6-P dehidrogenase.[47,48] GSH dapat disintesis di semua sel, namun kadar GSH tertinggi ditemukan di jaringan hati.[2]

Hubungan yang lemah antara aktivitas spesifik katalase dan MnSOD disebabkan juga karena letak kedua enzim tersebut berbeda. Aktivitas MnSOD terdapat pada mitokondria sedangkan mitokondria sel hati hanya mengandung sedikit katalase.[10] Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga sebelum sampai ke peroksisom, H_2O_2 dikonversi terlebih dahulu oleh GSH yang banyak terdapat pada sitosol sel hati. Halim melaporkan bahwa GSH digunakan sejak hari pertama hipoksia, dari penelitian ini didapat penurunan yang bermakna dari kadar GSH pada tikus hipoksia 1,3,7, dan 14 hari bila dibandingkan dengan kontrol.[12]

Hati adalah organ metabolik terbesar dan penting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama seperti karbohidrat, lemak dan protein. Vitalnya fungsi hati menyebabkan hati memiliki beberapa sistem pertahanan yang berfungsi untuk mencegah terjadinya kerusakan oksidatif pada sel tersebut. Beberapa antioksidan endogen banyak terdapat di hati antara lain enzim MnSOD dan katalase. Dari penelitian ini diketahui bahwa enzim MnSOD bersama antioksidan lain berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan hati. Analisis korelasi pearson menyatakan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim (aktivitas spesifik MnSOD, katalase, dan GPT) dengan kadar MDA lebih kuat bila dibandingkan dengan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar senyawa karbonil. Ini menunjukkan kerusakan hati masih dalam derajat kerusakan sedang. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jusman yang menyatakan terdapat derajat kerusakan sedang pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.[42] Hubungan antara aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar MDA adalah hubungan negatif sedang. Diduga selain ketiga enzim ini terdapat antioksidan lain yang bekerja mencegah kerusakan oksidatif. Antioksidan lain yang berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan hati adalah glutation. GSH, bentuk tereduksi dari glutation, paling banyak terdapat pada jaringan hati. Kadar GSH yang tinggi ini sesuai dengan aktivitas jalur *HMP shunt* yang tinggi di jaringan hati.[10] Hubungan yang paling kuat terdapat pada hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD dan kadar MDA, ini menunjukkan peran MnSOD sebagai antioksidan primer untuk mencegah

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

terjadinya kerusakan oksidatif. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan katalase positif lemah. Enzim MnSOD banyak terdapat di mitokondria dan berfungsi sebagai *scavenger* O_2.- menjadi H_2O_2. Sementara itu pada mitokondria sel hati hanya terdapat sedikit katalase. Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga perbedaan lokasi inilah yang menjadi sebab mengapa hanya didapat hubungan positif lemah, antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase.

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1.Kesimpulan

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

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

4.11. Saran

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

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

DAFTAR PUSTAKA

1. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. J Appl Physiol 2000;88:1474-80.

2. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and regulation of redoxresponsive transcription factors in development and physiology. Respir Res 2002;3:1-27.

3. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknows of hypoxia sensing. Acta Biochimia Polonnica 2004;5:437-46.

4. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. Cancer Epidemiol Biomarker Prev 2008;17(12):3298-305.

5. Harju T, Wiik RK, Sirvio R, Paakko P, Crapo JD,Oury TD, et al. Manganese superoxide dismutase is incresed in the airways of smokers' lungs. Eur Respir J 2004;24:765-71

6. Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH,Wei YH. Smoking associated mitochondrial DNA mutation and lipid peroxidation in human lung tissues. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;19:901-9.

7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular Respones to Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, Senescence and Death. In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007: 187-267

8. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stres in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. International Microbiology 2000;3:3-8

9. Dewi S. Ekspresi gen Manganese superoxide dismutase pada jantung,otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant Defences : Endogenous and Diet Derived. In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007 : 79-186

11. Sherwood L. Fisiologi manusia.edisi 2. Terjemahan.dr.Pendit BU. Jakarta:EGC.2001.Hal.565

12. Halim A. Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

13. Papandreou, I, Powell,A,Lim,AL & Denko,N. Cellular reaction to hypoxia : sensing and responding to an adverse environment. *Mutat Res* 2005 ; 569, 87-100

14. Vaupel P, Harisson L. Tumor hypoxia : causative factors, compensantory mechanism, and cellular respons. Oncologist.2004 ; 9 Suppl 5 : 4-9

15. Giaccia, AJ., *et al*. The Biology of Hypoxia: The Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function, and Disease. *Genes & Development*. 2004.18:2183-94)

16. Ran R, Xu H , Lu A , Bernaudin M , Sharp FR.Hypoxia preconditioning in the brain. Dev Neurosci 2005; 27:87-92

17. Simon HU, Yehia AH, Scaffer FL. Role of reavtive Oxygen species(ROS) in Apoptosis Induction. Apoptosis 2000;5:415-8

18. Semenza GL. Regulation of Mammalian O2 Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 Annual Review of Cell and Developmental Biology; 1999; 15:pg :551

19. Halliwell B, Gutteridge JMC. The Chemistry of Free Radicals and Related 'Reactive Species'.In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007 : 30-74

20. Oberly TD. Oxidative damage and cancer. American Journal of Pathology. 2002;160(2):403-8

21. Stryer L. Biochemistry.5thed.W.H. Freeman and Company

22. Oberley. Cell signaling enzyme. .[cited 2010 april 12]. Available from:http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/superoxide-dismutase.html

23. Jetawattana S. Role of MnSOD in the Regulation of HIF-1α. [Thesis].Graduate College University of Iowa. May 2008

24. Clair DS. Manganese superoxide dismutase : genetic variation and regulation. J Nutr [0022-3166/04]. 2004 [cited 2008 Apr 12];134:3190S-1S. Available from: The Pros and Cons of Antioxidants.

25. Kinnula VL, Torkkeli T, Kristo P, Sormunen R, Soini Y, Paako P, et al. Ultrastructural and chromosomal studies on manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol 2004; 31:147-53.

26. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutase in the lung and human lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:1600-19.

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

27. Ho JC, Zheng S, Comhair AAS, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. Cancer Res 2001;1:8578-85.

28. Quint P. Kinetic and Structural Effects of interfacial Interuption and Protein nitration in Human Manganese Superoxide Dismutase.Florida University.2006

29. Jefferson J, Perry P, Fan L, Tainer JA. Developing master key to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of protein controlling reactive oxygen species and DNA repair.Neuroscience 2007; 145(4):1280-99

30. Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L,Wain JC, et al. Manganese superoxide dismutase alanin to valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. J Natl Cancer Inst 2001;93:1818-21.

31. Catalase structure. Wikipedia Commons.[cited 2010 june 12]. Available from: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catalase_Structure.png.

32. Wisniewska et al. Human alanine aminotransferase 2 in complex with PLP.SGC.[cited 2010 june 15].available from : http://www.thesgc.org/structures/structure_description/3IHJ/

33. Alanine transaminase. Wikipedia foundation. . [cited 2010 june 15]. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alanine_amino_transf%C3%A9rase.png

34. Roudier E, Bachelet C, Perrin A. Pyruvate reduces DNA damage during hypoxia and after reoxygenation in hepatocellular carcinoma cells. FEBS Journal 274. Oct 2007; 5188–98

35. Lee JH, KwonWY, Io YH, Suh GJ and Youn YK. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. Human & Experimental Toxicology. 2008 27: 49-54

36. Junqueira,L.Carlos. Histologi Dasar. Terjemahan .Jan Tambayong. ed.8. Jakarta : EGC.1997

37. Microscopic structure of the liver. Britanica encyclopedia. [cited 2010 june 11]. Available from: http://www.britannica.com/bps/image /275485/60419/Microscopic-structure-of-the-liver-Liver-cells-or-hepatocytes-have. cited

38. Ferdinal F. Mekanisme molekuler gagal jantung yang diinduksi hipoksia : peran HIF-1α dalam regulasi gen BNP. Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Indonesia, 2008.

39. Yoshiro S, Chie S, Ryo K, Katsuhiro K. Reagen for GPT assay [cited 2010 March 5] Available from : http://www.freepatentsonline.com/6645735.html

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

40. Putri W N. Aktivitas spesifik katalase jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. [skripsi]. Jakarta:Universitas Indonesia ; 2008

41. Martin R, Fitzl G, mozet c, Martin H, welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxydative enzymes in rat liver and kidneys. Experimental gerontology. 2002; 37(12):1481-7

42. Jusman SWA. Respon jaringan hati terhadap hipoksia sistemik kronik : analisis regulasi ekspresi gen sitoglobin. Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Indonesia, 2010

43. Evendi A. Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktvitas spesifik dan pola isozim laktat dehidrogenase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

44. Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bünger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . Nov 2008. 279: H2431-H38

45. Margareth A. Aktivitas spesifik MnSOD pada darah penderita kanker paru dengan dengan riwayat merokok : hubungannya dengan stres oksidatif dan genotype[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

46. Nida K. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

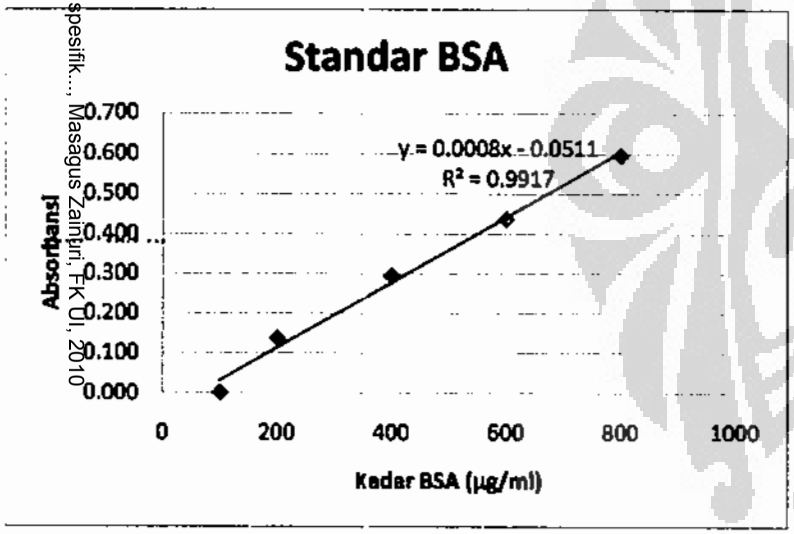
47. Storey, K.B, Storey J.M. Oxygen Limitation and Metabolic Rate Depression. In : Storey, K.B. editor. Functional metabolism : Regulation and Adaptation. John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004

48. Hermes-Lima,M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radical. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 1 . Kurva standar BSA untuk menentukan kadar protein total

kadar BSA	Å1	Å2	Rata Å
0.1	0.001	0.001	0.001
0.2	0.135	0.139	0.137
0.4	0.289	0.299	0.294
0.6	0.436	0.438	0.437
0.8	0.594	0.598	0.596



Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 2. Kadar protein total

sampel	A1	A2	Rata Å	Berat sampel hati (gram)	Berat sampel hati (mg)	kadar homogenat (mg jaringan/ml)	kadar protein pengenceran 500X (µgprotein/ml)	kadar protein pengenceran (µgprotein/ml)	kadar protein pengenceran (mgprotein/ml)	mg protein/mg jaringan
A1	0.076	0.096	0.086	0.1181	118.1	1181	171.375	85687.5	85.6875	0.072555038
A2	0.119	0.102	0.1105	0.1161	116.1	1161	202	101000	101	0.086993971
A3	0.058	0.053	0.0555	0.1014	101.4	1014	133.25	66625	66.625	0.065705128
A4	0.04	0.038	0.039	0.1131	113.1	1131	112.625	56312.5	56.3125	0.049790009
A5	0.082	0.093	0.0875	0.1065	106.5	1065	173.25	86625	86.625	0.081338028
B1	0.072	0.077	0.0745	0.1071	107.1	1071	157	78500	78.5	0.073295985
B2	0.056	0.055	0.0555	0.1043	104.3	1043	133.25	66625	66.625	0.063878236
B3	0.096	0.124	0.11	0.1111	111.1	1111	201.375	100687.5	100.6875	0.090627813
B4	0.06	0.072	0.066	0.098	98	980	146.375	73187.5	73.1875	0.074681122
B5	0.044	0.06	0.052	0.0951	95.1	951	128.875	64437.5	64.4375	0.067757624
C1	0.046	0.038	0.042	0.108	108	1080	116.375	58187.5	58.1875	0.053877315
C2	0.059	0.066	0.0625	0.1043	104.3	1043	142	71000	71	0.068072867
C3	0.055	0.077	0.066	0.1008	100.8	1008	146.375	73187.5	73.1875	0.072606647
C4	0.062	0.079	0.0705	0.11	110	1100	152	76000	76	0.069090909
C5	0.061	0.068	0.0645	0.0965	96.5	965	144.5	72250	72.25	0.074870466
D1	0.07	0.059	0.0645	0.11	110	1100	144.5	72250	72.25	0.065681818
D2	0.043	0.05	0.0465	0.0973	97.3	973	122	61000	61	0.062692703
D3	0.033	0.036	0.0345	0.1052	105.2	1052	107	53500	53.5	0.050855513
D4	0.056	0.042	0.049	0.112	112	1120	125.125	62562.5	62.5625	0.055859375
D5	0.073	0.063	0.068	0.0984	98.4	984	148.875	74437.5	74.4375	0.075647866
E1	0.098	0.099	0.0985	0.1149	114.9	1149	187	93500	93.5	0.081375109
E2	0.074	0.062	0.068	0.1034	103.4	1034	148.875	74437.5	74.4375	0.071989845
E3	0.1	0.1	0.1	0.1059	105.9	1059	188.875	94437.5	94.4375	0.08917611
E4	0.069	0.048	0.0585	0.1029	102.9	1029	137	68500	68.5	0.066569485

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

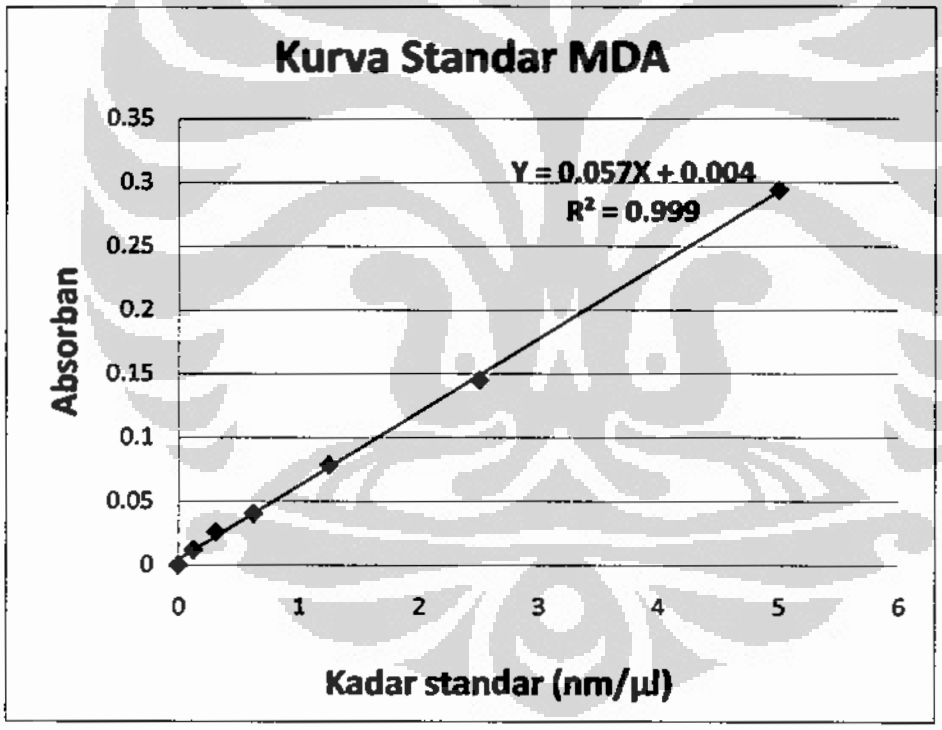
Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

lampiran 3. Kadar Senyawa Karbonil

Sampel	Kontrol1	kontrol2	rata kontrol	A1	A2	rata A	Corrected absorbance	kadar karbonil (nmol/ml)	kadar homogenat (mg/ml)	kadar karbonil (nmol/mg jaringan)	kadar protein (mg protein/ml)	kadar karbonil (nmol/mg protein)
A1	0.016	0.019	0.0175	0.044	0.042	0.043	0.0255	0.00000580	0.9700	0.0000059746954	85.69	0.000000068
A2	0.017	0.019	0.018	0.029	0.041	0.035	0.017	0.00000386	1.0200	0.0000037878788	101.00	0.000000038
A3	0.016	0.018	0.017	0.025	0.039	0.032	0.015	0.00000341	0.9580	0.0000035585500	66.63	0.000000051
A4	0.043	0.038	0.0405	0.054	0.051	0.0525	0.012	0.00000273	1.0410	0.0000026198585	56.31	0.000000048
A5	0.019	0.021	0.02	0.031	0.034	0.0325	0.0125	0.00000284	1.0000	0.0000028409091	86.63	0.000000033
								0.00000373		0.0000037563784		0.000000048
B1	0.028	0.021	0.0245	0.063	0.071	0.067	0.0425	0.00000966	0.9960	0.0000096978824	78.50	0.000000123
B2	0.041	0.037	0.039	0.084	0.092	0.088	0.049	0.00001114	0.9760	0.0000114102086	66.63	0.000000167
B3	0.027	0.022	0.0245	0.055	0.058	0.0565	0.032	0.00000727	1.1720	0.0000062053987	100.69	0.000000072
B4	0.017	0.016	0.0165	0.039	0.043	0.041	0.0245	0.00000557	1.0630	0.0000052381767	73.19	0.000000076
B5	0.011	0.016	0.0135	0.035	0.044	0.0395	0.026	0.00000591	1.1340	0.0000052108385	64.44	0.000000092
								0.00000791		0.0000075525010		0.000000106
C1	0.014	0.016	0.015	0.057	0.05	0.0535	0.0385	0.00000875	1.0340	0.0000084622824	58.19	0.000000150
C2	0.017	0.018	0.0175	0.046	0.024	0.035	0.0175	0.00000398	0.9840	0.0000040419438	71.00	0.000000056
C3	0.016	0.018	0.017	0.044	0.06	0.052	0.035	0.00000795	0.9790	0.0000081251741	73.19	0.000000109
C4	0.016	0.018	0.017	0.051	0.041	0.046	0.029	0.00000659	1.0630	0.0000062002908	76.00	0.000000087
C5	0.019	0.021	0.02	0.046	0.05	0.048	0.028	0.00000636	1.1710	0.0000054343607	72.25	0.000000088
								0.00000673		0.0000064528104		0.000000098
D1	0.023	0.019	0.021	0.06	0.059	0.0595	0.0385	0.00000875	0.9610	0.0000091050989	72.25	0.000000121
D2	0.046	0.04	0.043	0.06	0.061	0.0605	0.0175	0.00000398	0.9580	0.0000041516417	61.00	0.000000065
D3	0.063	0.06	0.0615	0.083	0.086	0.0845	0.023	0.00000523	1.0710	0.0000048807402	53.50	0.000000098
D4	0.038	0.035	0.0365	0.052	0.042	0.047	0.0105	0.00000239	0.9520	0.0000025066845	62.56	0.000000038
D5	0.067	0.065	0.066	0.096	0.084	0.09	0.024	0.00000545	1.0200	0.0000053475936	74.44	0.000000073
								0.00000516		0.0000051983518		0.000000079
E1	0.026	0.023	0.0245	0.041	0.044	0.0425	0.018	0.00000409	1.0840	0.0000037739014	93.50	0.000000044
E2	0.019	0.018	0.0185	0.045	0.047	0.046	0.0275	0.00000625	0.9810	0.0000063710499	74.44	0.000000084
E3	0.021	0.02	0.0205	0.042	0.036	0.039	0.0185	0.00000420	1.0790	0.0000038967057	94.44	0.000000045
E4	0.029	0.028	0.0285	0.064	0.05	0.057	0.0285	0.00000648	1.0890	0.0000059479088	68.50	0.000000095
								0.00000526		0.0000049973915		0.000000067

Lampiran 4. Kurva Standar MDA

	A1	A2	Rata A	Kadar	Rata A uji - rata A Blangko
Blangko	0.009	0.006	0.0075	0	0
S1	0.019	0.02	0.0195	0.125	0.012
S2	0.034	0.033	0.0335	0.3125	0.026
S3	0.049	0.047	0.048	0.625	0.0405
S4	0.087	0.085	0.086	1.25	0.0785
S5	0.148	0.157	0.1525	2.5	0.145
S6	0.296	0.307	0.3015	5	0.294



Lampiran 5. Kadar MDA

Sampel	A1	A2	Rata A	Kadar MDA pengenceran (nm/µL)	kadar MDA (nm/µl)	Berat hati(mg)	kadar homogenat (mg/µl)	Kadar MDA (nm/mg)
A1	0.205	0.19	0.1975	3.39474	13.5789	118.1	1.181	11.50
A2	0.124	0.104	0.114	1.92982	7.7193	110.4	1.104	6.99
A3	0.147	0.139	0.143	2.4386	9.75439	111.1	1.111	8.78
A4	0.143	0.138	0.1405	2.39474	9.57895	109.2	1.092	8.77
A5	0.22	0.206	0.213	3.66667	14.6667	111.2	1.112	13.19
							RATA-RATA	9.85
B1	0.455	0.363	0.409	7.10526	28.4211	116	1.16	24.50
B2	0.436	0.452	0.444	7.7193	30.8772	101.2	1.012	30.51
B3	0.412	0.403	0.4075	7.07895	28.3158	118.7	1.187	23.85
B4	0.134	0.095	0.1145	1.9386	7.75439	116.7	1.167	6.64
B5	0.151	0.189	0.17	2.91228	11.6491	105.3	1.053	11.06
							RATA-RATA	19.31
C1	0.21	0.186	0.198	3.40351	13.614	120.1	1.201	11.34
C2	0.178	0.218	0.198	3.40351	13.614	116.3	1.163	11.71
C3	0.111	0.13	0.1205	2.04386	8.17544	100	1	8.18
C4	0.035	0.038	0.0365	0.57018	2.2807	105.3	1.053	2.17
C5	0.08	0.109	0.0945	1.58772	6.35088	119	1.19	5.34
							RATA-RATA	7.74
D1	0.087	0.087	0.087	1.45614	5.82456	103.4	1.034	5.63
D2	0.044	0.047	0.0455	0.72807	2.91228	104.1	1.041	2.80
D3	0.078	0.084	0.081	1.35088	5.40351	105.2	1.052	5.14
D4	0.14	0.134	0.137	2.33333	9.33333	107.8	1.078	8.66
D5	0.051	0.047	0.049	0.78947	3.15789	123.5	1.235	2.56
							RATA-RATA	4.96
E1	0.036	0.04	0.038	0.59649	2.38596	118.7	1.187	2.01
E2	0.04	0.042	0.041	0.64912	2.59649	122.2	1.222	2.12
E3	0.048	0.058	0.053	0.85965	3.4386	101.2	1.012	3.40
E4	0.043	0.045	0.044	0.70175	2.80702	104.4	1.044	2.69
							RATA-RATA	2.56

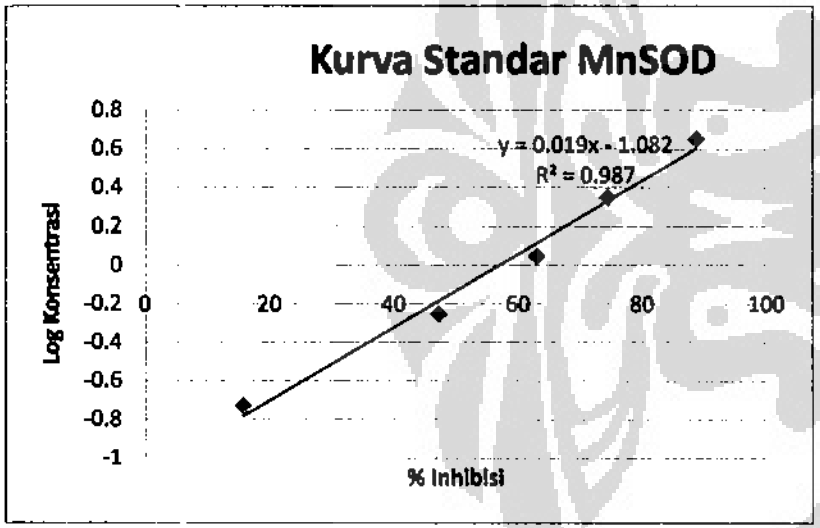
Lampiran 6. Aktivitas spesifik katalase

	A1			A2									
sampel	0	1	2	0	1	2	Δ(1'-2')1	Δ(1'-2')2	Rata Δ(1'-2')S	Rata Δ(S-B)	aktivitas katalase	(mg protein/ml)	Aktivitas Spesifik
A1	0.295	0.269	0.25	0.277	0.26	0.235	0.019	0.025	0.022	0.0185	6.801470588	85.6875	0.079375295
A2	0.287	0.259	0.242	0.277	0.257	0.254	0.017	0.003	0.01	0.0065	2.389705882	101	0.023660454
A3	0.343	0.32	0.308	0.286	0.256	0.236	0.012	0.02	0.016	0.0125	4.595588235	66.625	0.068976934
A4	0.298	0.253	0.221	0.285	0.246	0.214	0.032	0.032	0.032	0.0285	10.47794118	56.3125	0.186067768
A5	0.328	0.304	0.27	0.302	0.278	0.252	0.034	0.026	0.03	0.0265	9.742647059	86.625	0.11246923
B1	0.31	0.308	0.296	0.316	0.304	0.3	0.012	0.004	0.008	0.0045	1.654411765	78.5	0.021075309
B2	0.341	0.328	0.319	0.317	0.3	0.295	0.009	0.005	0.007	0.0035	1.286764706	66.625	0.019313542
B3	0.31	0.294	0.284	0.301	0.282	0.258	0.01	0.024	0.017	0.0135	4.963235294	100.6875	0.04929346
B4	0.292	0.269	0.24	0.283	0.27	0.25	0.029	0.02	0.0245	0.021	7.720588235	73.1875	0.105490531
B5	0.289	0.27	0.252	0.284	0.264	0.237	0.018	0.027	0.0225	0.019	6.985294118	64.4375	0.108404176
C1	0.286	0.269	0.249	0.262	0.233	0.215	0.02	0.018	0.019	0.0155	5.698529412	58.1875	0.09793391
C2	0.282	0.255	0.226	0.281	0.245	0.225	0.029	0.02	0.0245	0.021	7.720588235	71	0.108740679
C3	0.288	0.246	0.211	0.287	0.235	0.203	0.035	0.032	0.0335	0.03	11.02941176	73.1875	0.150700759
C4	0.279	0.24	0.215	0.295	0.272	0.239	0.025	0.033	0.029	0.0255	9.375	76	0.123355263
C5	0.311	0.278	0.252	0.291	0.259	0.233	0.026	0.026	0.026	0.0225	8.272058824	72.25	0.114492164
D1	0.302	0.285	0.272	0.323	0.304	0.293	0.013	0.011	0.012	0.0085	3.125	72.25	0.043252595
D2	0.282	0.258	0.239	0.325	0.298	0.278	0.019	0.02	0.0195	0.016	5.882352941	61	0.096432015
D3	0.292	0.277	0.256	0.311	0.293	0.26	0.021	0.033	0.027	0.0235	8.639705882	53.5	0.16148983
D4	0.31	0.295	0.28	0.291	0.264	0.253	0.015	0.011	0.013	0.0095	3.492647059	62.5625	0.055826526
D5	0.333	0.322	0.308	0.343	0.32	0.306	0.014	0.014	0.014	0.0105	3.860294118	74.4375	0.051859535
E1	0.336	0.314	0.294	0.355	0.324	0.302	0.02	0.022	0.021	0.0175	6.433823529	93.5	0.068810947
E2	0.307	0.267	0.246	0.327	0.313	0.307	0.021	0.006	0.0135	0.01	3.676470588	74.4375	0.049390033
E3	0.357	0.322	0.294	0.353	0.31	0.296	0.028	0.014	0.021	0.0175	6.433823529	94.4375	0.068127847
E4	0.36	0.341	0.323	0.324	0.319	0.305	0.018	0.014	0.016	0.0125	4.595588235	68.5	0.067088879
B	0.366	0.352	0.348	0.452	0.438	0.435	0.004	0.003	0.0035				0.063354427

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 7. Kurva standar MnSOD

standar	Konsentr	A1	A3	Delta A	A1	A3	Delta A	rata delta	rata delt	% Inhibis	Log Konsentrasi
s1		0.041	0.11	0.069	0.043	0.114	0.071	0.07	0.0233		
s2	0.1867	0.038	0.096	0.058	0.04	0.1	0.060	0.059	0.0197	15.714	-0.7289
s3	0.56	0.045	0.081	0.036	0.047	0.085	0.038	0.037	0.0123	47.143	-0.2518
s4	1.12	0.046	0.071	0.025	0.049	0.076	0.027	0.026	0.0087	62.857	0.04922
s5	2.24	0.041	0.058	0.017	0.044	0.063	0.019	0.018	0.006	74.286	0.35025
s6	4.48	0.033	0.04	0.007	0.037	0.046	0.009	0.008	0.0027	88.571	0.65128



Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 8. Aktivitas spesifik MnSOD

sampel	A1	A2	ΔA	A1	A2	ΔA	rataΔA	rataΔA/me	% Inhibis	log Konsi	konsentrasi pengenceran	Aktivitas MnSOD u/ml	protein (mg protein /ml)	Aktivitas Spesifik MnSOD U/mg
A1	0.059	0.075	0.016	0.044	0.065	0.021	0.0185	0.0062	73.5714	0.3159	2.0695	51.7365	85.688	0.60378133
A2	0.05	0.078	0.028	0.046	0.073	0.027	0.0275	0.0092	60.7143	0.0716	1.1792	29.4789	101	0.29187041
A3	0.054	0.077	0.023	0.046	0.064	0.018	0.0205	0.0068	70.7143	0.2616	1.8263	45.6574	66.625	0.68528972
A4	0.05	0.075	0.025	0.069	0.092	0.023	0.024	0.0080	65.7143	0.1666	1.4675	36.6869	56.313	0.65148831
A5	0.071	0.088	0.017	0.041	0.053	0.012	0.0145	0.0048	79.2857	0.4244	2.6572	66.4307	86.625	0.76687633
B1	0.067	0.082	0.015	0.038	0.062	0.024	0.0195	0.0065	72.1429	0.2887	1.9441	48.6020	78.5	0.61913398
B2	0.049	0.076	0.027	0.054	0.081	0.027	0.027	0.0090	61.4286	0.0851	1.2166	30.4147	66.625	0.45650511
B3	0.043	0.066	0.023	0.041	0.07	0.029	0.026	0.0087	62.8571	0.1123	1.2950	32.3762	100.69	0.32155122
B4	0.047	0.073	0.026	0.051	0.077	0.026	0.026	0.0087	62.8571	0.1123	1.2950	32.3762	73.188	0.4423732
B5	0.061	0.08	0.019	0.052	0.069	0.017	0.018	0.0060	74.2857	0.3294	2.1352	53.3788	64.438	0.82838056
C1	0.047	0.066	0.019	0.046	0.065	0.019	0.019	0.0063	72.8571	0.3023	2.0058	50.1448	58.188	0.86177923
C2	0.044	0.067	0.023	0.044	0.067	0.023	0.023	0.0077	67.1429	0.1937	1.5621	39.0530	71	0.55004212
C3	0.057	0.067	0.01	0.05	0.075	0.025	0.0175	0.0058	75.0000	0.3430	2.2029	55.0732	73.188	0.75249409
C4	0.04	0.062	0.022	0.049	0.063	0.014	0.018	0.0060	74.2857	0.3294	2.1352	53.3788	76	0.70235227
C5	0.044	0.063	0.019	0.039	0.06	0.021	0.02	0.0067	71.4286	0.2751	1.8843	47.1067	72.25	0.65199612
D1	0.043	0.064	0.021	0.05	0.066	0.016	0.0185	0.0062	73.5714	0.3159	2.0695	51.7365	72.25	0.7160763
D2	0.047	0.065	0.018	0.049	0.066	0.017	0.0175	0.0058	75.0000	0.3430	2.2029	55.0732	61	0.90283871
D3	0.04	0.064	0.024	0.04	0.061	0.021	0.0225	0.0075	67.8571	0.2073	1.6117	40.2926	53.5	0.75313346
D4	0.056	0.067	0.011	0.042	0.062	0.02	0.0155	0.0052	77.8571	0.3973	2.4962	62.4059	62.563	0.99749707
D5	0.048	0.068	0.02	0.036	0.054	0.018	0.019	0.0063	72.8571	0.3023	2.0058	50.1448	74.438	0.67364943
E1	0.074	0.087	0.013	0.045	0.057	0.012	0.0125	0.0042	82.1429	0.4787	3.0110	75.2756	93.5	0.80508676
E2	0.049	0.072	0.023	0.042	0.058	0.016	0.0195	0.0065	72.1429	0.2887	1.9441	48.6020	74.438	0.65292382
E3	0.057	0.07	0.013	0.048	0.063	0.015	0.014	0.0047	80.0000	0.4380	2.7416	68.5394	94.438	0.72576418
E4	0.066	0.083	0.017	0.044	0.059	0.015	0.016	0.0053	77.1429	0.3837	2.4194	60.4859	68.5	0.88300614

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 9. Hasil Analisis Uji Statistik Uji T

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA	Katalase	Karbonil	GPT	MnSOD
N		24	24	24	24	24
Normal Parameters[a,b]	Mean	9.1475	.0846512	.000000060025	.000141232133	.6789954
	Std. Deviation	7.54086	.04416302	.0000000354434	.000041552137	.17429996
Most Extreme Differences	Absolute	.200	.139	.101	.106	.146
	Positive	.200	.139	.101	.106	.066
	Negative	-.172	-.070	-.091	-.080	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.981	.679	.493	.519	.713
Asymp. Sig. (2-tailed)		.290	.745	.968	.950	.689

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MDA	Hipoksia 1 Hari	5	9.8460	2.46824	1.10383
	Kontrol	5	7.7480	4.05275	1.81244

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MDA	Equal variances assumed	1.499	.256	.989	8	.352	2.09800	2.12212	-2.79562	6.99162
	Equal variances not assumed			.989	6.608	.358	2.09800	2.12212	-2.98092	7.17692

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MDA	Hipoksia 7 Hari	5	19.3120	10.01972	4.48095
	Kontrol	5	7.7480	4.05275	1.81244

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MDA	Equal variances assumed	8.115	.022	2.392	8	.044	11.56400	4.83362	.41765	22.71035
	Equal variances not assumed			2.392	5.275	.060	11.56400	4.83362	-.66909	23.79709

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MDA	Hipoksia 14 Hari	5	4.9580	2.47976	1.10898
	Kontrol	5	7.7460	4.05275	1.81244

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MDA	Equal variances assumed	1.661	.234	-1.313	8	.226	-2.79000	2.12481	-7.68981	2.10981
	Equal variances not assumed			-1.313	6.627	.233	-2.79000	2.12481	-7.87228	2.29228

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MDA	Hipoksia 21 Hari	4	2.5550	.63731	.31866
	Kontrol	5	7.7480	4.05275	1.81244

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MDA	Equal variances assumed	7.617	.028	-2.504	7	.041	-5.19300	2.07409	-10.09744	-.28856
	Equal variances not assumed			-2.822	4.246	.045	-5.19300	1.84024	-10.18781	-.19819

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Karbonil	Hipoksia 1 Hari	5	.000000047657	.0000000134287	.0000000060055
	Kontrol	5	.000000097976	.0000000348051	.0000000155653

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Karbonil	Equal variances assumed	2.529	.150	-3.016	8	.017	.000000503196	.000000166837	.0000008879	.0000001185
	Equal variances not assumed			-3.016	5.165	.028	.000000503196	.000000166837	.0000009280	.0000000784

Group Statistics

Sampel		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Karbonil	Hipoksia 7 Hari	5	.000000106042	.0000000395910	.0000000177056
	Kontrol	5	.000000097976	.0000000348051	.0000000155653

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Karbonil	Equal variances assumed	.236	.640	.342	8	.741	.0000000080657	.0000000235747	.0000000462977	.0000000624291
	Equal variances not assumed			.342	7.871	.741	.0000000080657	.0000000235747	.0000000464535	.0000000625849

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Karbonil	Hipoksia 14 Hari	5	.000000079087	.0000000316832	.0000000141692
	Kontrol	5	.000000097976	.0000000346051	.0000000155653

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Karbonil	Equal variances assumed	.007	.935	-.897	8	.396	000000188893	000000210486	00000006743	0000000296489
	Equal variances not assumed			-.897	7.930	.396	000000188893	000000210486	00000006750	0000000297231

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Karbonil	Hipoksia 21 Hari	4	.000000066699	.0000000264105	.0000000132053
	Kontrol	5	.000000097976	.0000000348051	.0000000155653

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Karbonil	Equal variances assumed	.065	.806	-1.481	7	.182	-.0000000312771	.0000000211192	.0000000812162	.0000000188620
	Equal variances not assumed			-1.532	6.997	.169	-.0000000312771	.0000000204122	.0000000795483	.0000000169941

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GPT	Hipoksia 1 Hari	5	.000139684420	.0000445460286	.0000199215896
	Kontrol	5	.000140487000	.0000326245923	.0000145901612

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
GPT	Equal variances assumed	.135	.722	-.033	8	.975	-.00000080258	.0000246929654	-.000057744660	.0000561395002
	Equal variances not assumed			-.033	7.332	.975	-.00000080258	.0000246929654	-.000058659959	.0000570547994

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GPT	Hipokela 7 Hari	5	.00012673914	.0000442787303	.0000198020502
	Kontrol	5	.00014048700	.0000326245923	.0000145901612

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
GPT	Equal variances assumed	.713	.423	-.559	8	.592	-.0000137478600	.0000245966257	-.00007046778	.0000429720606
	Equal variances not assumed			-.559	7.354	.593	-.0000137478600	.0000245966257	-.00007134625	.0000438505280

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GPT	Hipoksia 14 Hari	5	.000118850080	.0000275756847	.000012332221
	Kontrol	5	.000140487000	.0000326245923	.000014590181

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
GPT	Equal variances assumed	.006	.940	-1.133	8	.290	-.0000216369200	.0000191038342	-.000065690441	.0000224166007
	Equal variances not assumed			-1.133	7.784	.291	-.0000216369200	.0000191038342	-.000065904095	.0000226302545

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GPT	Hipoksia 21 Hari	4	.00019019200	.0000340311156	.0000170155578
	Kontrol	5	.00014048700	.0000326245923	.0000145901612

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
GPT	Equal variances assumed	.019	.894	2.229	7	.061	.0000497050000	.0000222944995	-.0000030131142	.000102423114
	Equal variances not assumed			2.218	6.427	.065	.0000497050000	.0000224143260	-.0000042689918	.000103876992

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Katalase	Hipoksia 1 Hari	5	.0941099	.06042602	.02702334
	Kontrol	5	.1190446	.01995777	.00892539

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Katalase	Equal variances assumed	3.259	.109	-.876	8	.406	-.02493462	.02845915	-.090582	04069230
	Equal variances not assumed			-.876	4.862	.422	-.02493462	.02845915	-.098718	04884888

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Katalase	Hipoksia 7 Hari	5	.0607154	.04386041	.01961497
	Kontrol	5	.1190446	.01995777	.00892539

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Katalase	Equal variance assumed	7.225	.028	-2.707	8	.027	05832915	02155017	-.108024	-.008634
	Equal variance not assumed			-2.707	5.588	.038	05832915	02155017	-.112017	-.004642

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Katalase	Hipoksia 14 Hari	5	.0817721	.04904466	.02193344
	Kontrol	5	.1190446	.01995777	.00892539

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Katalase	Equal variances assumed	3.575	.095	-1.574	8	.154	-.03727245	.02367991	-.091878	01733353
	Equal variances not assumed			-1.574	5.289	.173	-.03727245	.02367991	-.097155	02261054

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Katalase	Hipoksia 21 Hari	4	.0633544	.00933648	.00466824
	Kontrol	5	.1190446	.01995777	.00892539

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Katalase	Equal variances assumed	1.365	.281	-5.100	7	.001	-.05569013	.01091946	-.081511	-.029870
	Equal variances not assumed			-5.529	5.899	.002	-.05569013	.01007249	-.080439	-.030941

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MnSOD	Hipoksia 1 Hari	5	.5998612	.18216143	.08146507
	Kontrol	5	.7037328	.11581856	.05179563

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MnSOD	Equal variances assumed	.429	.531	-1.076	8	.313	-.10387155	.09653675	-.326486	.11874260
	Equal variances not assumed			-1.076	6.780	.319	-.10387155	.09653675	-.333657	.12591383

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MnSOD	Hipoksia 7 Hari	5	.5335888	.19585854	.08759060
	Kontrol	5	.7037328	.11581856	.05179563

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MnSOD	Equal variances assumed	1.686	.230	-1.672	8	.133	.17014395	.10175904	-.404801	06451280
	Equal variances not assumed			-1.672	6.493	.142	.17014395	.10175904	-.414630	07434256

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MnSOD	Hipoksia 14 Hari	5	.8086390	.13639289	.06099666
	Kontrol	5	.7037328	.11581856	.05179563

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MnSOD	Equal variances assumed	.625	.452	1.311	8	.226	.10490623	.08002113	-.079623	.28943527
	Equal variances not assumed			1.311	7.795	.227	.10490623	.08002113	-.080470	.29028238

Group Statistics

	Sampel	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MnSOD	Hipoksia 21 Hari	4	.7666952	.09936703	.04968352
	Kontrol	5	.7037328	.11581856	.05179563

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MnSOD	Equal variances assumed	.018	.897	.861	7	.418	.06296246	.07316784	-.110052	23597690
	Equal variances not assumed			.877	6.928	.410	.06296246	.07177214	-.107112	23303729

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Lampiran 10. Hasil Uji Analisis Statistik Korelasi Pearson

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
MnSOD	.6769954	.17429996	24
MDA	9.1475	7.54086	24

Correlations

		MnSOD	MDA
Pearson Correlation	MnSOD	1.000	-.442
	MDA	-.442	1.000
Sig. (1-tailed)	MnSOD	.	.015
	MDA	.015	.
N	MnSOD	24	24
	MDA	24	24

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	MDA[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MnSOD

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Model Summary[b]

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.442[a]	.195	.159	.15987193

a. Predictors: (Constant), MDA

b. Dependent Variable: MnSOD

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.136	1	.136	5.339	.031[a]
	Residual	.562	22	.026		
	Total	.699	23			

a. Predictors: (Constant), MDA

b. Dependent Variable: MnSOD

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.772	.052		14.865	.000	.665	.880
	MDA	-.010	.004	-.442	-2.311	.031	-.019	-.001

a. Dependent Variable: MnSOD

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Residuals Statistics[a]

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	.4607939	.7516995	.6789954	.07702404	24
Residual	-.409162	.31352222	.00000000	.15635784	24
Std. Predicted Value	-2.833	.947	.000	1.000	24
Std. Residual	-2.559	1.961	.000	.978	24

a. Dependent Variable: MnSOD

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
MnSOD	.6789954	.17429996	24
Karbonil	.000000080025	.0000000354434	24

Correlations

		MnSOD	Karbonil
Pearson Correlation	MnSOD	1.000	-.014
	Karbonil	-.014	1.000
Sig. (1-tailed)	MnSOD	.	.474
	Karbonil	.474	.
N	MnSOD	24	24
	Karbonil	24	24

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Karbonil[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MnSOD

Model Summary[b]

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.014[a]	.000	-.045	.17819938

a. Predictors: (Constant), Karbonil

b. Dependent Variable: MnSOD

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.000	1	.000	.004	.948[a]
	Residual	.699	22	.032		
	Total	.699	23			

a. Predictors: (Constent), Karbonil

b. Dependent Variable: MnSOD

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constsnt)	.685	.091		7.487	.000	.495	.874
	Karbonil	-69737.2	1048351	-.014	-.067	.948	-2243883.095	2104408.761

a. Dependent Variable: MnSOD

Residuals Statistics[a]

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	.6729196	.6822891	.6789954	.00247172	24
Residual	-.390038	.31558096	.00000000	.17428243	24
Std. Predicted Value	-2.458	1.333	.000	1.000	24
Std. Residual	-2.189	1.771	.000	.978	24

a. Dependent Variable: MnSOD

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
MnSOD	.6789954	.17429996	24
GPT	.000141232133	.0000415521389	24

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

Correlations

		MnSOD	GPT
Pearson Correlation	MnSOD	1.000	.228
	GPT	.228	1.000
Sig. (1-tailed)	MnSOD	.	.142
	GPT	.142	.
N	MnSOD	24	24
	GPT	24	24

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	GPT[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MnSOD

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.228[a]	.052	.009	.17353220

a. Predictors: (Constant), GPT

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

(Lanjutan)

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.036	1	.036	1.204	.284[a]
	Residual	.662	22	.030		
	Total	.699	23			

a. Predictors: (Constant), GPT

b. Dependent Variable: MnSOD

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.544	.128		4.251	.000	.279	.809
	GPT	955.499	870.809	.228	1.097	.284	-850.446	2761.446

a. Dependent Variable: MnSOD

Aktivitas spesifik..., Masagus Zainuri, FK UI, 2010

Biodata Penulis

Nama	: Masagus Zainuri
Tempat / Tanggal Lahir	: Jakarta / 7 Juli 1980
Alamat	: Kayumanis Va Lama No.219 Jaktim
Agama	: Islam
Pekerjaan	: Staf Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan Badan Litbangkes Kemkes RI
Riwayat Pendidikan	: Profesi Dokter Gigi, Universitas Indonesia , tahun 2002-2005
	S1 Kedokteran Gigi UI, tahun 1999-2002
	SMUN 54 Jakarta, tahun 1995-1998
	SMPN 26 Jakarta, tahun 1992-1995
	SDN kebon Manggis 15 Jakarta, tahun 1986-1992
Pengalaman Penelitian	: -
Sumber Dana Penelitian	: Dana DIPA Badan Litbangkes Kemkes RI

Penulis

Masagus Zainuri

UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 80 /PT02.FK/ETIK/2010

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL --- CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

"Aktivitas Spesifik Enzim Manganese Superoksida Dismutase (MnSOD) pada Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik: Hubungannya dengan Stres Oksidafit dan Fungsi Hati".

Peneliti Utama : **Masagus Zainuri**
Name of the principal investigator

Nama Institusi : **Program Magister Ilmu Biomedik Biokimia Molekuler FKUI**

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.valuasi
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, 22 Februari 2010

Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Aktivitas spesifik enzim *manganese superoxide dismutase*, katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik : Hubungannya dengan kerusakan oksidatif

Masagus Zainuri

Abstrak

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

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

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

ROS terdiri dari radikal (superoksida, radikal hidroksil, alkoxyl, dan peroxyl) dan non radikal (hidrogen peroksida dan hipoklorida).[4] Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar sehingga bersifat tidak stabil. Radikal bebas berusaha tetap menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel.[4,5] Jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel.[6]

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

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

oleh karena itu jumlahnya pada suatu jaringan tergantung banyak tidaknya mitokondria pada jaringan tersebut. Pada eritrosit mamalia dimana tidak terdapat mitokondria, tidak ditemukan MnSOD, sedangkan pada hati tikus aktivitas MnSOD merupakan 10% aktivitas total SOD. Aktivitas MnSOD berbeda pada berbagai macam organ dan dipengaruhi oleh beberapa keadaan misalnya hipoksia. Jumlah relatif MnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya. Penelitian yang dilakukan di laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia melaporkan bahwa sel jantung, otak, dan darah mempunyai pola ekspresi gen dan aktivitas MnSOD yang berbeda pada kondisi hipoksia sistemik kronis. Hal ini menggambarkan respon jaringan yang berbeda-beda.[9] H_2O_2 yang dihasilkan oleh MnSOD akan diuraikan menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim katalase. Pada hewan, katalase terdapat pada semua organ, khususnya di hati.[10]

Hati adalah organ metabolik terbesar dan terpenting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama (karbohidrat, lemak, protein), detoksifikasi atau degradasi zat-zat sisa, sintesis berbagai protein plasma dan penyimpanan glikogen.[11] Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenus). Gradien oksigen ini makin bertambah karena adanya proses metabolisme yang mengkonsumsi oksigen pada sel-sel parenkim dan membuat tekanan oksigen menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35mmHg di vena sentral. Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam regulasi gen yang mengkode enzim-enzim untuk metabolisme karbohidrat. Sebagai contoh , enzim-enzim glikolisis seperti piruvat kinase ekspresinya menguat pada area yang kurang aerob yaitu zona perivenus, sedangkan enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan ekspresinya di zona periportal yang lebih aerob.[12]

Enzim glutamat piruvat transaminase (GPT) banyak terdapat di sitosol sel hati. . Enzim GPT mengkatalisis reaksi perubahan asam amino alanin dan α-ketoglutarat menjadi piruvat dan glutamat. Dibandingkan sel lain, aktivitas GPT tertinggi pada sel hati. Apabila terjadi kerusakan hati, akan terjadi gangguan sintesis enzim GPT, yang menyebabkan menurunnya aktivitas GPT di hati. Pada kerusakan hati enzim GPT akan terdapat pada darah. Hal ini yang membuat aktivitas enzim GPT pada darah, digunakan sebagai petanda terjadinya kerusakan hati. Pada penelitian ini akan dianalisis aktivitas spesifik MnSOD, katalase dan glutamat piruvat transaminase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik dan hubungannya dengan stres oksidatif.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hati hewan coba. Hati hewan coba yang digunakan adalah hati tikus jantan strain Sprague Dawley. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dilakukan di bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, sampel penelitian yang dipakai dalam penelitian besar ini adalah tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus novergicus L*), berumur 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok tikus hipoksia 1,7,14 dan 21 hari, serta 1 kelompok kontrol.

Penimbangan Hati

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

Pembuatan Homogenat hati

Untuk pemeriksaan MDA, senyawa karbonil, GPT dan katalase, jaringan hati dilumatkan dengan micropestle dan homogenizer dalam 1 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7.0 dan PMSF, sedangkan untuk pemeriksaan MnSOD, jaringan hati dilumatkan dengan menggunakan micropestle dan homogenizer dalam 50 µl *nuclei lysis solution* dan PMSF. Homogenat kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang dalam tabung yang bersih dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

Pemeriksaan aktifitas spesifik enzim MnSOD

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

pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detikpertama setelah penambahan enzim (A_1) dan 3 menit kemudian (A_2).

Perhitungan = ΔA/menit (sampel maupun standar)=

$$\frac{A1-A3}{3}$$

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

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

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ sampel/mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/mnt})}$$

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

Pemeriksaan aktifitas spesifik enzim katalase

Pemeriksaan aktivitas katalase dilakukan dengan menggunakan metode Mates. Optimasi dilakukan terlebih dahulu sebelum pemeriksaan sampel. Dari hasil optimasi pengenceran sampel optimum adalah 500X, dan waktu optimum adalah pada saat menit ke 2. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 210 nm, setelah blangko atau sampel uji dicampur dengan H_2O_2 reaksi akan berjalan, t_0 adalah 30 detik setelah pencampuran, t_1 adalah 1 menit setelah t_0, dan seterusnya.

Pemeriksaan Aktivitas enzim GPT

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

Perhitungan

ΔA/menit

$$\text{Aktifitas GPT} = \frac{\frac{(\Delta A1 - \Delta A2) + (\Delta A2 - \Delta A3)}{10}}{2}$$

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

Pemeriksaan kadar MDA dan Kadar Karbonil

Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Metode ini berdasarkan prinsip bahwa bila MDA direaksikan dengan TCA pada suhu 97^{0}C akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang akan memberikan serapan pada panjang gelombang 530 nm. Jumlah MDA yang terbentuk akan menggambarkan proses peroksidasi lipid. Pemeriksaan karbonil dilakukan dengan prinsip reaksi antara 2,4-dinitrophenylhidrazine (DNPH) dan protein karbonil yang akan menghasilkan hidrazon, yang dapat diukur pada panjang gelombang 370 nm. Protein karbonil dihitung dengan menggunakan rumus :

Protein karbonil (nmol/ml) =

[(CA)/(*0.011 µM^{-1})] (250 µL / 100 µL)

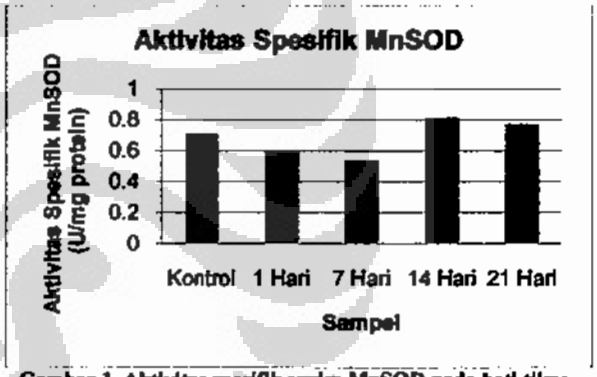
CA = *corrected absorbance* =

absorban uji – absorban kontrol

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas spesifik enzim MnSOD



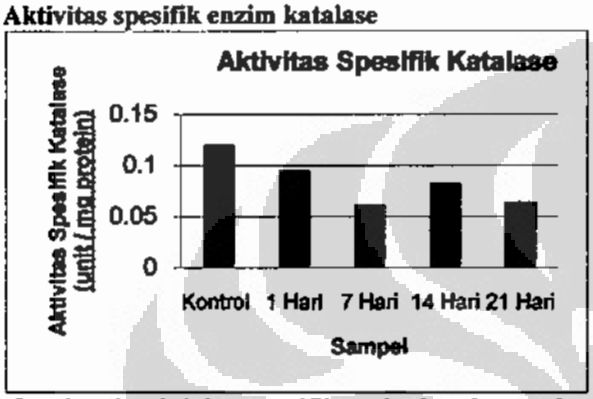
Gambar 1. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 , 7 , 14 dan 21 hari

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

Menurunnya aktivitas MnSOD pada hipoksia 1 dan 7 hari diduga disebabkan karena

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

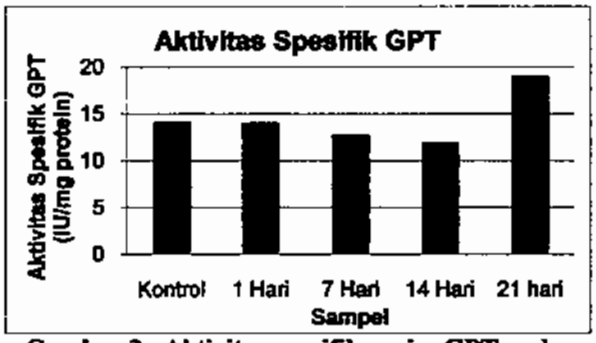
Aktivitas spesifik enzim katalase



Gambar 2. Aktivitas spesifik enzim katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p<0.05$)

Aktivitas spesifik enzim katalase secara keseluruhan mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kontrol. Pada tikus hipoksia 7 dan 21 hari, penurunan aktivitas enzim katalase secara statistik bermakna bila dibandingkan dengan kontrol dengan nilai $p= 0.038$ dan $p= 0.001$. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Putri di bagian Biokima dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran UI melaporkan bahwa pada kondisi hipoksia bipobarik terjadi penurunan aktivitas katalase pada hati tikus.[13] Studi yang dilakukan Martin melaporkan bahwa pada hipoksia hipobarik dapat menyebahkan penurunan bermakna ekspresi mRNA enzim-enzim antioksidan yang ada di hati, termasuk katalase.[14]

Aktivitas Spesifik GPT



Gambar 3. Aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 21, dan 14 hari

Hasil pemeriksaan aktivitas spesifik enzim GPT pada hati tikus yang diinduksi hipoksia ditunjukkan oleh gambar diatas. Secara umum tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas spesifik enzim GPT pada kelompok uji bila dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas GPT cenderung mengalami sedikit penurunan pada kondisi hipoksia 1, 7, dan 14 hari. Pada hipoksia 21 hari terjadi peningkatan aktivitas GPT, rata-rata aktivitas GPT pada tikus yang diinduksi hipoksia 21 hari sebesar $19{,}01 \times 10^{-5}$ IU/mg protein, sedangkan rata-rata aktivitas GPT pada hati tikus kontrol sebesar $14{,}04 \times 10^{-5}$ IU/mg protein, namun peningkatan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0.061$).

Penurunan aktivitas GPT pada kondisi hipoksia 1 sampai 14 hari menunjukkan adanya kerusakan hati, namun kerusakan ini tidak terlalu berat karena tingginya kadar antioksidan yang terdapat pada sel hati. Penelitian yang dilakukan Jusman di Laboratorium Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia menyebutkan babwa kerusakan pada jaringan hati meningkat seiring dengan adanya hipoksia, akan tetapi masih dalam batas kerusakan sedang.[15]

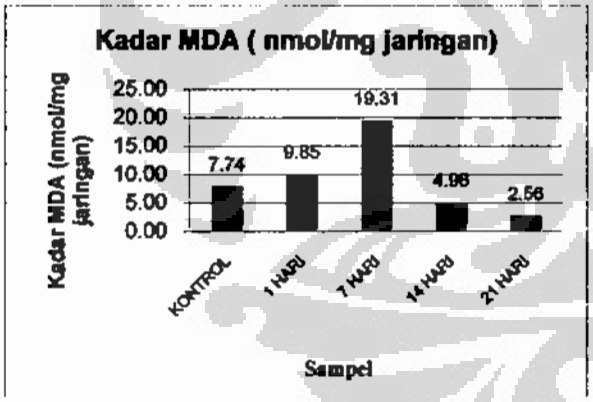
Enzim GPT mengkatalisis reaksi perubahan alanin menjadi piruvat. Peningkatan aktivitas enzim GPT pada hipoksia 21 hari diduga karena diperlukannya piruvat dalam metabolisme anaerob. Hasil ini sesuai dengan penelitian Evendi yang melaporkan terjadi peningkatan ekspresi isozim LDH1 dan LDH2 selama keadaan hipoksia. Isozim LDH1 dan LDH2 berperan mengubah laktat menjadi piruvat.[16] Diduga piruvat yang terbentuk diubah menjadi glukosa 6-fosfat yang selanjutnya akan masuk kedalam jalur *HMP shunt*. *HMP shunt* berperan menghasilkan NADPH yang dibutuhkan untuk proses reduksi GSSG menjadi GSH, dimana GSH berperan sebagai antioksidan.

Penelitian lain menyebutkan peran piruvat sebagai antioksidan dengan menghambat kerja NADH oksidase. Seperti diketahui sebelumnya NADH oksidase adalah sumber utama dari

terbentuknya superoksida. Akibat penghambatan pembentukan $O_2^{\cdot-}$ oleh piruvat, maka akan terjadi penghambatan pada proses peroksidasi lipid dan pembentukan senyawa karbonil. Penelitian yang dilakukan Eberhard dkk melaporkan bahwa piruvat mempunyai efek antioksidan dengan mengandengkan dua reaksi, yaitu antara reaksi reduksi piruvat menjadi laktat yang dikatalisis oleh enzim laktat dehidrogenase dan oksidasi NADH menjadi NAD yang dikatalis oleh NADH oksidase. Dari penelitian yang sama pula dilaporkan bahwa hubungan kadar piruvat dan penghambatan NADH oksidase memiliki batas kadar piruvat maksimal dimana daya penghambatan NADH oksidase menjadi tetap.[17] Diduga hal ini yang menyebabkan sel tidak terlalu banyak meningkatkan aktivitas enzim GPT pada hipoksia 21 hari, agar didapat kadar optimal dari piruvat.

Penelitian yang dilakukan Roudier dkk melaporkan bahwa piruvat dapat mengurangi kerusakan DNA selama terjadinya hipoksia pada karsinoma sel hati.[18] Lee dkk melaporkan dalam penelitiannya bahwa etil piruvat, suatu senyawa piruvat yang mengalami modifikasi agar lebih stabil dalam larutan, secara bermakna dapat menurunkan kadar MDA dan senyawa NO yang terbentuk pada jantung dan hati tikus yang diintoksikasi dengan paraquat.[18]

Kadar MDA

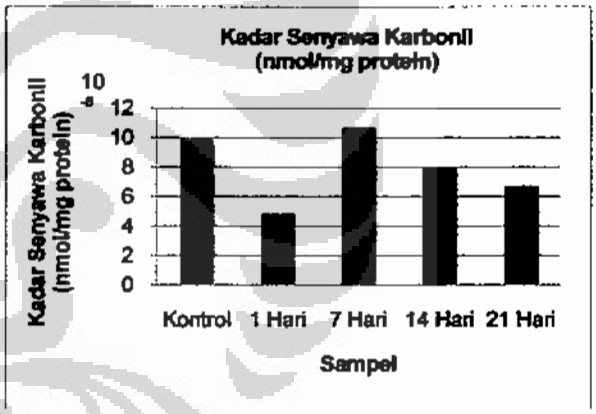


Gambar 4. Kadar MDA pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia 1 hari, 7 hari 14 bari dan 21 hari. Tanda * menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik terhadap kelompok kontrol (Uji T, p<0.05)

Dari gambar 4 terlihat kenaikan kadar MDA sampai Hipoksia hari ke-7, kemudian mengalami penurunan sampai hipoksia 21 hari. Kadar MDA pada tikus hipoksia 7 hari tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol (p= 0,06) sedangkan penurunan kadar MDA pada tikus hipoksia 21 hari berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol (p= 0,045). Hipoksia akan menyebabkan peningkatan kadar ROS. Pembentukan ROS yang berlebihan dapat melampaui kemampuan netralisir dari antioksidan. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya kerusakan oksidatif yang menyebabkan kerusakan berbagai makromolekul dalam sel. Peningkatan kadar MDA menunjukkan meningkatnya stres oksidatif akibat terjadinya hipoksia. Penelitian yang dilakukan Halim menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kadar MDA pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.[12]

Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA. Pada kondisi ini diduga telah terjadi perubahan regulasi pertahanan terhadap stres oksidatif yang terjadi pada jaringan hati. Kemungkinan lain adalah terbatasnya kadar oksigen pada sel menyebabkan berkurangnya propagasi pada proses pembentukan MDA, karena untuk terjadinya propagasi dibutuhkan oksigen, sehingga MDA yang dihasilkan hanya berasal dari ROS yang terbentuk akibat hipoksia.

Kadar senyawa karbonil

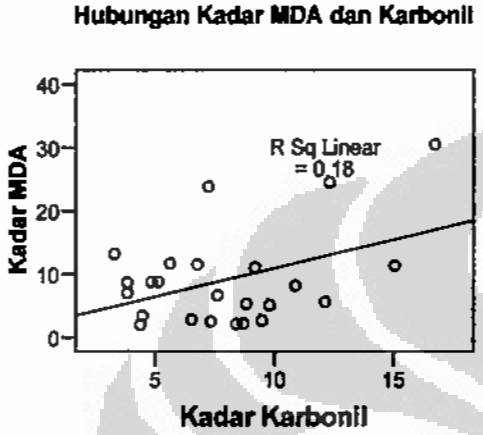


Gambar 5. Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 hari dan 21 hari

Dari gambar diatas terlihat secara keseluruhan kadar senyawa karbonil yang cenderung menurun dengan bertambahnya hipoksia, namun penurunan ini secara statistik tidak bermakna (p>0.05) . Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat adanya $O_2^{\cdot-}$ dan MDA. $O_2^{\cdot-}$ yang terbentuk pada keadaan hipoksia dapat mengalami protonasi menjadi $OH^{\cdot}$, dimana $OH^{\cdot}$ jauh lebih bersifat reaktif bila dibandingkan $O_2^{\cdot-}$. Pada pH fisiologis terjadi keseimbangan antara jumlah $O_2^{\cdot-}$ dan $OH^{\cdot}$, namun pada permukan membran dimana pH nya lebih

sedikit asam, akan terjadi protonasi dari $O_2^{\cdot-}$ menjadi $OH^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$ dapat menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid membran dan menyebabkan terbentuknya MDA.[7] Penurunan kadar karbonil diduga karena banyaknya konversi $O_2^{\cdot-}$ menjadi $OH^{\cdot}$, namun pembentukan senyawa karbonil oleh MDA belum terjadi.

Hubungan kadar MDA dan kadar karbonil

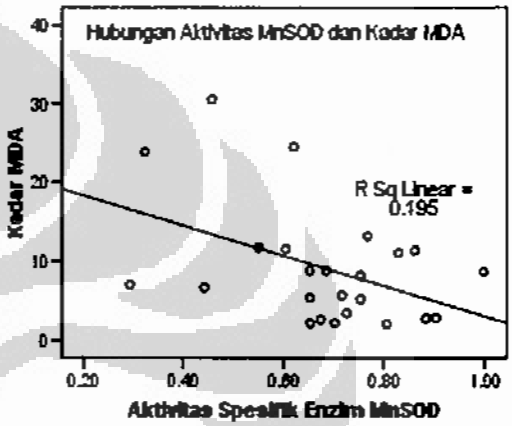


Gambar 6. Hubungan antara kadar MDA dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan bermakna positif sedang (R= 0,424, p<0.05)

Dari gambar diatas, terlihat secara keseluruhan pola diagram batang antara kadar MDA dan karbonil serupa. Pada hipoksia 1 dan 7 hari didapat perbandingan kadar MDA yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan produksi MDA terjadi pada tahap awal hipoksia. Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari didapat perbandingan kadar karbonil yang lebih tinggi dibandingkan perbandingan kadar MDA. Hal ini menunjukkan produksi karbonil yang terjadi pada keadaan hipoksia lanjut. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Margaret yang menyatakan pada darah penderita kanker paru yang telah lanjut didapat kadar karbonil yang tinggi dan kadar MDA yang rendah,[19] sedangkan penelitian lain (data Nida dan belum dipublikasi) pada tikus dengan kanker payudara pasca induksi DMBA melaporkan kadar MDA plasma yang tinggi dan kadar karbonil plasma rendah.[20] Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang positif sedang antara kadar MDA dan karbonil. Dengan demikian disimpulkan kenaikan kadar MDA akan diikuti kenaikan kadar karbonil. Senyawa karbonil dapat dibentuk akibat reaksi antara MDA dan protein atau reaksi oksidasi rantai samping protein oleh ROS. Hal ini yang menyebabkan hubungan yang tidak begitu kuat antara MDA dan karbonil.

Penelitian ini mendapatkan hasil kadar MDA yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar karbonil. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan yang terjadi pada jaringan hati akibat hipoksia belum terlalu besar. Diduga sistem pertahanan antioksidan hati yang baik mencegah kerusakan hati yang lebih lanjut. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Jusman yang menyatakan kerusakan hati sedang terjadi pada tikus hipoksia.[15]

Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan kerusakan oksidatif

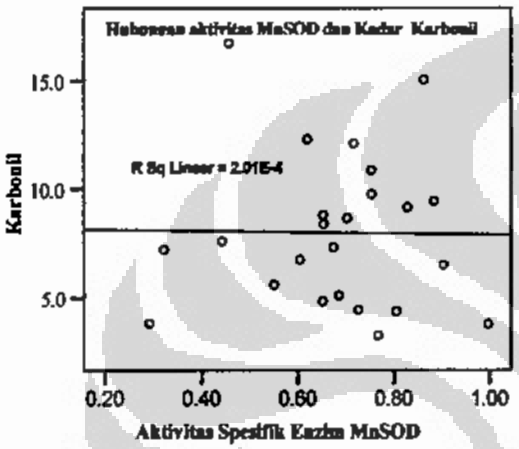


Gambar 7. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan bermakna negatif sedang (R= -0,442, p<0.05)

Dari gambar 7 terlihat pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipoksia sistemik kronik ditemukan adanya hubungan negatif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar MDA (R = -0,442). Hubungan ini secara statistik bermakna (p =0,031). Sampai hipoksia 7 hari kadar MDA terus meningkat, hal ini menandakan keadaan stres oksidatif yang terus meningkat, disebabkan peningkatan produksi ROS. Sementara itu aktivitas spesifik MnSOD cenderung menurun sampai hipoksia 7 hari. Hal ini diduga karena produksi ROS yang terjadi sangat berlebihan, keadaan ini menyebabkan enzim MnSOD menjadi jenuh, sehingga tidak mampu lagi mengikat substrat $O_2^{\cdot-}$ saat dilakukan pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD. Dewi melaporkan bahwa pada jaringan jantung dan darah, pada kondisi hipoksia 1 hari terjadi penurunan aktivitas MnSOD dan ekspresi mRNA MnSOD.[9] Hati merupakan tempat metabolisme utama, sehingga kemungkinan jumlah ROS yang terbentuk di hati akan lebih banyak dibandingkan yang terdapat dalam jantung dan darah.

Diduga hal ini yang menyebabkan penurunan aktivitas MnSOD sampai hari ketujuh pada hipoksia di hati.

Pada kondisi hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas spesifik MnSOD, diduga telah terjadi perubahan pengaturan sistem pertahanan sel. Produksi ROS yang terus meningkat sejalan dengan keadaan hipoksia ditekan oleh sistem pertahanan sel yang lain, hal ini yang menyebabkan kadar MDA menurun, sementara itu enzim MnSOD menjadi tidak jenuh oleh substrat, sehingga pada saat pengukuran aktivitas spesifiknya meningkat.

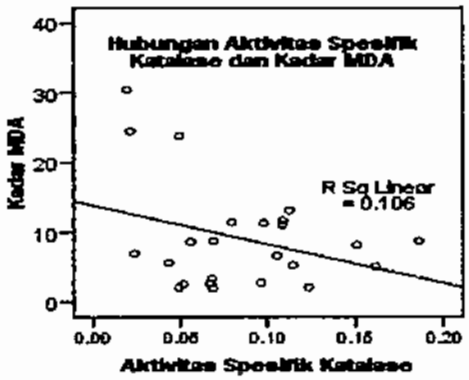


Gambar 8. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,014, p>0.05)

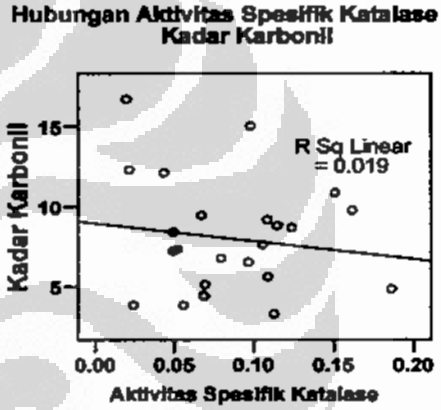
Gambar 8 menunjukkan *scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar senyawa karbonil pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Dari hasil analisis korelasi pearson didapat hubungan yang negatif lemah (R = -0,014) antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan kadar senyawa karbonil, hubungan ini tidak bermakna secara statistik.

Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan yang lebih erat antara MDA dan MnSOD hila dibandingkan karbonil dan MnSOD. Hal ini menggambarkan keadaan sel hati yang belum mengalami kerusakan lanjut, sehingga aktivitas MnSOD lebih dimaksudkan untuk mengatasi peningkatan kadar MDA dibandingkan kadar karbonil. Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa enzim MnSOD berperan untuk mengatasi stres oksidatif pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

Hubungan aktivitas spesifik katalase dan kerusakan oksidatif



Gambar 9. Hubungan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif sedang (R= -0,326, p>0.05)



Gambar 10. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim katalase dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,138, p>0.05)

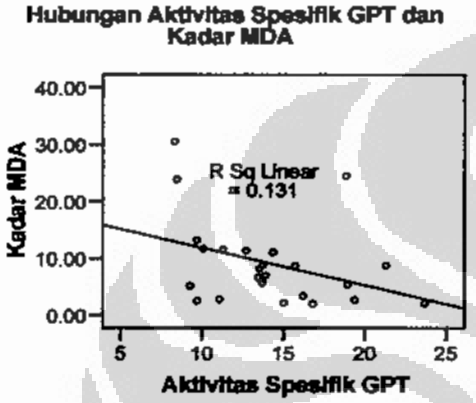
Dari gambar 9 terlihat pola yang berlawanan antara aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA. Analisis korelasi pearson menyatakan terdapat hubungan negatif sedang antar keduanya. Pada gambar 10 terlihat hasil analisis korelasi pearson antara aktivitas spesifik katalase dan kadar senyawa karbonil dimana didapatkan hubungan lemah (R=-0,138). Hal ini menunjukkan adanya peran katalase dalam menghambat pembentukan MDA dan karbonil.

MDA merupakan hasil dari peroksidasi lipid. MDA dapat bereaksi dengan protein sehingga terbentuk senyawa karbonil. Proses peroksidasi lipid dimulai dengan pengambilan hidrogen dari PUFA oleh $OH^{\cdot}$. $OH^{\cdot}$ dapat dibentuk dari reaksi antara $O2^{\cdot-}$ dan H_2O_2. Katalase merupakan enzim yang berperan untuk mengkonversi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2.

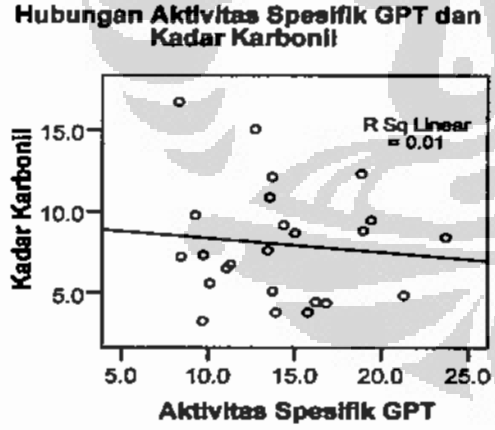
Dengan demikian katalase mencegah pembentukan $OH^{\cdot}$ dan secara tidak langsung mencegah pembentukan MDA dan karbonil.

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

Hubungan aktivitas spesifik GPT dan kerusakan oksidatif



Gambar 11. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar MDA. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif sedang (R= -0,362, p>0.05)



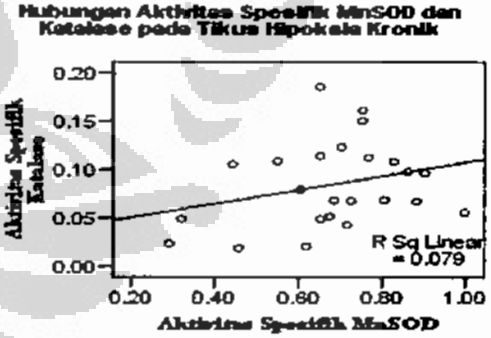
Gambar 12. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim GPT dan kadar karbonil. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan negatif lemah (R= -0,101, p>0.05)

Pada gambar 11 terlihat pola yang saling berlawanan antara aktivitas GPT dan kadar MDA. Dari analisis korelasi pearson didapat hubungan negatif sedang (R=-0.362). Hal ini menunjukkan peningkatan stres oksidatif akan menghambat aktivitas GPT. Diduga peningkatan stres oksidatif akan menyebabkan modifikasi ataupun kerusakan pada struktur enzim GPT. Hubungan yang tidak terlalu kuat antara kadar MDA, sebagai indikator stres oksidatif, dan aktivitas GPT, diduga disebabkan adanya antioksidan yang bekerja melawan stres oksidatif. Selain MnSOD dan katalase, Glutation peroksidase juga berperan sebagai antioksidan dengan mereduksi hidroperoksida dan peroksida lipid.[15]

Penelitian yang dilakukan Jusman melaporkan terdapat hubungan yang negatif kuat antara kadar MDA dan GSH. MDA sebagai indikator stres oksidatif meningkat sebanding dengan lamanya hipoksia, sedangkan GSH menurun dengan lamanya hipoksia. GSH sudah mengalami penurunan sejak awal hipoksia dan berlanjut sampai akhir waktu perlakuan pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan penggunaan GSH sebagai antioksidan pada jaringan hati dilakukan sejak hari pertama.[15]

Dari gambar 12 terlihat bubungan yang lemah antara aktivitas GPT dan kadar senyawa karbonil. dari hasil analisis pearson didapat hubungan tidak bermakna negatif lemah antara aktivitas GPT dan kadar senyawa karbonil. bal ini menunjukkan kerusakan pada enzim GPT hanya sedikit sehingga tidak berpengaruh pada kadar senyawa karbonil yang terbentuk.

Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan aktivitas spesifik katalase



Gambar 13. Hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik enzim katalase. Hasil analisis korelasi pearson menyatakan hubungan positif lemah (R= 0,281, p>0.05)

Enzim Katalase merupakan enzim yang berperan sebagai *scavenger* H_2O_2 yang dihasilkan oleh MnSOD menjadi O_2 dan H_2O. Adanya pola yang sama antara MnSOD dan katalase, menunjukkan bahwa katalase bekerja sejak dari

hipoksia 1 hari. Dari literatur diketahui bahwa katalase bekerja pada konsentrasi H_2O_2 yang tinggi,[10] sehingga dapat disimpulkan pada kondisi hipoksia 1 hari telah terjadi produksi H_2O_2 yang tinggi oleh MnSOD. Hasil analisis statistik menunjukkan hubungan yang positif lemah. Hubungan yang positif lemah ini mungkin disebabkan ada sistem lain yang juga bekerja sebagai *scavenger* H_2O_2. Antioksidan lain yang dapat berperan sebagai *scavenger* H_2O_2 misalnya GSH. Fungsi GSH disebabkan oleh adanya gugus –SH. GSH dapat dioksidasi menjadi GSSG dan H_2O , kemudian GSSG akan direduksi kembali menjadi GSH dengan bantuan enzim glutation reduktase, enzim ini membutuhkan kofaktor NADPH, NADPH ini berasal dari *HMP Shunt*, yaitu reaksi yang dikatalisis oleh enzim glukosa 6-P dehidrogenase.[21,22] GSH dapat disintesis di semua sel, namun kadar GSH tertinggi ditemukan di jaringan hati.[2]

Hubungan yang lemah antara aktivitas spesifik katalase dan MnSOD disebabkan juga karena letak kedua enzim tersebut berbeda. Aktivitas MnSOD terdapat pada mitokondria sedangkan mitokondria sel hati hanya mengandung sedikit katalase.[10] Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga sebelum sampai ke peroksisom, H_2O_2 dikonversi terlebih dahulu oleb GSH yang banyak terdapat pada sitosol sel hati. Halim melaporkan bahwa GSH digunakan sejak hari pertama hipoksia. Dari penelitian ini didapat penurunan yang bermakna dari kadar GSH pada tikus hipoksia 1,3,7, dan 14 hari bila dibandingkan dengan kontrol.[12]

Hati adalah organ metabolik terbesar dan penting ditubuh. Beberapa fungsi hati antara lain untuk pengolahan metabolit nutrien utama seperti karbohidrat, lemak dan protein. Vitalnya fungsi bati menyebabkan hati memiliki beberapa sistem pertahanan yang berfungsi untuk mencegah terjadinya kerusakan oksidatif pada sel tersebut. Beberapa antioksidan endogen banyak terdapat di hati antara lain enzim MnSOD dan katalase. Dari penelitian ini diketahui bahwa enzim MnSOD bersama antioksidan lain berperan mencegah terjadinya stres oksidatif di jaringan hati. Analisis korelasi pearson menyatakan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim (aktivitas spesifik MnSOD, katalase, dan GPT) dengan kadar MDA lebih kuat bila dibandingkan dengan hubungan aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar senyawa karbonil. Ini menunjukkan kerusakan hati masih dalam derajat kerusakan sedang. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jusman yang menyatakan terdapat derajat kerusakan sedang pada hati yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.[13] Hubungan antara aktivitas spesifik ketiga enzim dengan kadar MDA adalah hubungan negatif sedang. Diduga selain ketiga enzim ini terdapat antioksidan lain yang bekerja melawan stres oksidatif. Antioksidan lain yang berperan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di jaringan hati adalah glutation. GSH, bentuk tereduksi dari glutation, paling banyak terdapat pada jaringan hati. Kadar GSH yang tinggi ini sesuai dengan aktivitas jalur *HMP shunt* yang tinggi di jaringan hati.[10] Hubungan yang paling kuat terdapat pada hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD dan kadar MDA, ini menunjukkan peran MnSOD sebagai antioksidan primer untuk mencegah terjadinya stres oksidatif. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dan katalase positif lemah. Enzim MnSOD banyak terdapat di mitokondria dan berfungsi sebagai *scavenger* $O_2^{\cdot-}$ menjadi H_2O_2. Sementara itu pada mitokondria sel hati hanya terdapat sedikit katalase. Katalase banyak terdapat pada peroksisom. Diduga perbedaan lokasi inilah yang menjadi sebab mengapa hanya didapat hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dan aktivitas spesifik katalase.

Dari hasil penelitian ini disimpulkan babwa jaringan bati memiliki sistem pertahanan antioksidan yang cukup baik terhadap stres oksidatif yang terjadi, sehingga sel hati lebih tahan terhadap kemungkinan terjadinya kerusakan oksidatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. J Appl Physiol 2000;88:1474-80.

2. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and regulation of redoxresponsive transcription factors in development and physiology. Respir Res 2002;3:1-27.

3. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknows of hypoxia sensing. Acta Biochimia Polonnica 2004;5:437-46.

4. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. Cancer Epidemiol Biomarker Prev 2008;17(12):3298-305.

5. Harju T, Wiik RK, Sirvio R, Paakko P, Crapo JD,Oury TD, et al. Manganese superoxide dismutase is incresed in the airways of smokers' lungs. Eur Respir J 2004;24:765-71

6. Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH,Wei YH. Smoking associated mitochondrial DNA mutation and lipid

peroxidation in human lung tissues. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;19:901-9.

7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular Respones to Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, Senescence and Death. In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007: 187-267

8. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stres in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. International Microbiology 2000;3:3-8

9. Dewi S. Ekspresi gen Manganese superoxide dismutase pada jantung,otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant Defences : Endogenous and Diet Derived. In Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London. Oxford. University Press ; 2007 : 79-186

11. Sherwood L. Fisiologi manusia.edisi 2. Terjemahan.dr.Pendit BU. Jakarta:EGC.2001.Hal.565

12. Halim A. Stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.

13. Putri W N. Aktivitas spesifik katalase jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. [skripsi]. Jakarta:Universitas Indonesia ; 2008

14. Martin R, Fitzl G, mozet c, Martin H, welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxydative enzymes in rat liver and kidneys. Experimental gerontology. 2002; 37(12):1481-7

15. Jusman SWA. Respon jaringan hati terhadap hipoksia sistemik kronik : analisis regulasi ekspresi gen sitoglobin. Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Indonesia, 2010

16. Evendi A. Analisis hubungan konsumsi glukosa, aktvitas spesifik dan pola isozim laktat dehidrogenase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

17. Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bünger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . Nov 2008. 279: H2431-H38

18. Roudier E, Bachelet C, Perrin A. Pyruvate reduces DNA damage durin hypoxia and after reoxygenation in bepatocellular carcinoma cells. FEBS Journal 274. Oct 2007; 5188–98

19. Margareth A. Aktivitas spesifik MnSOD pada darah penderita kanker paru dengan dengan riwayat merokok : hubungannya dengan stres oksidatif dan genotype[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

20. Nida K. Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA[tesis]. Jakarta:Universitas Indonesia;2008

21. Storey, K.B, Storey J.M. Oxygen Limitation and Metabolic Rate Depression. In : Storey, K.B. editor. Functional metabolism : Regulation and Adaptation. John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004

22. Hermes-Lima,M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radical. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004