

Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dan paru tikus *Sprague dawley* setelah diberi daun ara

Ferdian^{1,*}, David Limanan², Frans Ferdinal², Eny Yulianti²

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

² Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

*korespondensi email: davidl@fk.untar.ac.id

ABSTRAK

Hipoksia merupakan keadaan kekurangan oksigen yang dapat menyebabkan stres oksidatif apabila terjadi ketidakseimbangan prooksidan dan antioksidan. Dalam menyeimbangkan hipoksia, tubuh membutuhkan antioksidan yaitu katalase sebagai antioksidan endogen dan daun ara sebagai antioksidan eksogen. Studi ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap aktivitas spesifik katalase darah dan organ paru tikus setelah diberi daun ara. Studi ini merupakan studi eksperimental in vitro terhadap aktivitas spesifik katalase tikus yang dihipoksia sistemik kronik setelah pemberian ekstrak daun ara. Ekstrak daun ara didapatkan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Tikus *Sprague dawley* dibagi menjadi 8 kelompok dengan setiap kelompok berisi 4 ekor tikus yang dibagi menjadi 2 kelompok dosis ekstrak daun ara yaitu dosis kental (300 mg/KgBB/hari) dan dosis encer (150 mg/KgBB/hari). Tiap kelompok dosis dibagi lagi menjadi kelompok tidak dihipoksia, kelompok hipoksia (8% O₂, 96% N₂) 1, 3 dan 7 hari. Aktivitas spesifik katalase diukur dengan metode Mates. Hasil studi ini didapatkan peningkatan aktivitas spesifik katalase paru dan darah pada hari pertama yang disebabkan oleh hipoksia dan penurunan aktivitas spesifik katalase setelah diberikan ekstrak daun ara. Terdapat korelasi antara aktivitas spesifik katalase paru dan darah pada kelompok kental, namun tidak pada kelompok encer. Studi ini menyimpulkan bahwa hipoksia akan menyebabkan stres oksidatif, yang akan direduksi oleh antioksidan endogen maupun eksogen.

Kata kunci: daun ara, katalase, hipoksia, stres oksidatif

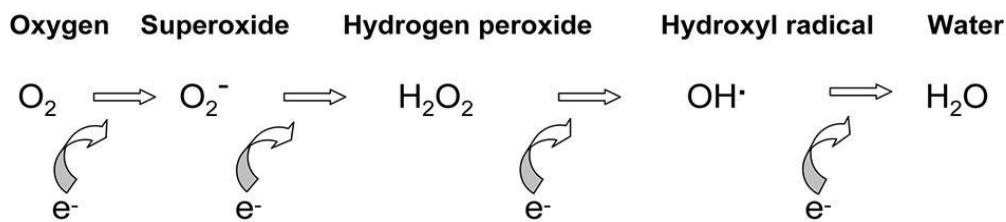
PENDAHULUAN

Oksigen merupakan gas terbanyak kedua di udara setelah nitrogen dan menjadi kebutuhan dasar makhluk hidup. Oksigen memiliki peranan penting dalam metabolisme, transpor kimia, keseimbangan asam-basa, maupun pemberian nutrisi pada sel. Dalam peranannya dalam membentuk Adenosin Trifosfat (ATP), oksigen berperan sebagai akseptor elektron.¹⁻³ Tubuh dapat mengalami ke-

kurangan oksigen yang disebut hipoksia. Hipoksia dapat terjadi dalam keadaan fisiologis seperti pada saat olahraga atau berada di dataran tinggi dan patologis dikarenakan adanya inflamasi, penyakit paru dan *infark miokard*.^{2,3} Pada dasarnya, hipoksia terbagi dalam beberapa tipe seperti *hypoxic hypoxia* yaitu terjadinya hipoksia akibat kurangnya pertukaran oksigen di paru,

anemic hypoxia yaitu terjadinya hipoksia karena oksigen tidak terdistribusi ke jaringan yang dituju, *stagnant hypoxia* dikarenakan tidak cukupnya aliran darah seperti pada gagal jantung, dan *histologic hypoxia* yang merupakan ketidakmampuan jaringan dalam menggunakan oksigen yang didistribusikan. Kekurangan oksigen atau hipoksia akan menimbulkan berbagai kompensasi tubuh seperti hiperventilasi, curah jantung meningkat dan juga peningkatan *Hypoxia Inducible Factor* (HIF).⁴

Kekurangan oksigen menyebabkan peningkatan oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada mitokondria tepatnya kompleks III.⁵ Pembentukan ROS dapat berasal dari endogen dan eksogen. Transport elektron merupakan salah satu sumber endogen. Kebocoran elektron dalam transport elektron akan mengikat oksigen sehingga menjadi oksigen reaktif dan radikal (Gambar 1), selain itu ROS juga bisa didapat dari sumber eksogen seperti polusi, asap rokok, obat-obat ataupun radiasi.^{6,7}



Gambar 1. Kebocoran electron dalam pembentukan ROS.⁸

ROS secara garis besar terbagi menjadi tiga macam, yaitu: anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\bullet), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). ROS dibutuhkan dalam menjaga homeostasis redox (reduksi dan oksidasi) pada sel dalam konsentrasi yang normal, namun dapat merugikan pada konsentrasi ROS yang tinggi. Modifikasi makromolekul dapat terjadi sehingga menimbulkan berbagai kerusakan dan penyakit seperti asma, fibrosis paru,

bronkitis, penyakit paru obstruksi kronik atau kanker.^{6,8-10} ROS yang meningkat harus diimbangi oleh antioksidan, yang merupakan molekul dengan kemampuan untuk memperlambat atau mencegah oksidasi dari suatu molekul. Antioksidan dapat berasal dari dalam tubuh yaitu superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase dan juga dapat diperoleh dari luar tubuh seperti vitamin A, vitamin E, tomat, daun Ara.^{6,11}

Katalase merupakan enzim oksido-reduktase yang terletak di peroksisom. Katalase sebagai enzim memiliki *turn over number* tertinggi dalam mereduksi hidrogen peroksida ($\sim 10^7$ M/Sec) sehingga menjadikan katalase sebagai antioksidan yang penting. Katalase memiliki dominansi dalam pengaturan konsentrasi hidrogen peroksida. Katalase merupakan enzim intraseluler dimana banyak ditemukan di liver, eritrosit, paru-paru dan juga ginjal.^{12,13}

Antioksidan eksogen juga diperlukan untuk mengimbangi prooksidan serta membantu antioksidan endogen melawan radikal bebas. Salah satu antioksidan eksogen dapat berasal dari daun ara (*Ficus auriculata Lour*) yang memiliki kapasitas antioksidan karena mengandung flavonoid (kaempferol, quercetin, myricetin), asam betulinik, stigmasterol, lupeol, bergapten, myricetin, scopoletin, β sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosida, dan quercetin-3-O- β -D-glucopiranosida.^{14,15}

Melihat kandungan daun ara yang dapat berperan sebagai antioksidan, mendorong penulis untuk melakukan studi untuk melihat efek daun ara terhadap antioksidan endogen katalase setelah diberi beban hipoksia sistemik kronik.

METODE PENELITIAN

Studi ini bersifat eksperimental *in vivo* terhadap hewan coba tikus *Sprague*

Dawley jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 g yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Studi ini telah mendapatkan surat identifikasi tanaman yang diuji (*Ficus auriculata Lour*) dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dengan nomor 1746/IPH.1.01/lf.07/VIII/2016 dan persetujuan lolos kaji etik dengan nomor 111/KER/FK/I/2017.

Studi ini menggunakan 4 ekor tikus dalam setiap kelompok yang didapatkan dari rumus Federer.¹⁶ Tikus akan terbagi menjadi 8 kelompok, dengan jumlah sampel 32 ekor tikus. Tikus akan diberikan ekstrak daun ara. Cara mendapatkan ekstrak daun ara diawali dengan mengeringkan daun ara, kemudian dimaserasi dengan etanol selama 3x24 jam dan ditampung setiap 24 jam sekali. Hasil tampungan disaring dengan kertas saring Whatman no.1, kemudian diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* hingga berbentuk seperti pasta.

Ekstrak daun ara diberikan dalam 2 dosis berbeda yaitu 300 mg/KgBB/hari (n=16) sebagai dosis A dan 150 mg/KgBB/hari (n=16) sebagai dosis B selama 14 hari. Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok tanpa perlakuan hipoksia, kelompok hipoksia 1 hari, kelompok

hipoksia 3 hari dan kelompok hipoksia 7 hari dimana setiap kelompok berisi 4 ekor tikus dosis A dan 4 ekor tikus dosis B. Kelompok percobaan hipoksia dimasukan kedalam sungkup yang dialirkan gas O₂ 8% sebagai sumber udara utama. Sungkup dibersihkan 2 hari sekali dan diberi makanan standar laboratorium hewan coba secara *ad libitum*. Pada akhir perlakuan, tikus dikeluarkan dan dianestesi dengan ketamine (75-100mg/kgBB) dan Xylazine (5-10mg/kgBB) yang dilakukan di daerah intraperitoneal. Pengambilan organ dan darah dilakukan dengan pembedahan, darah diambil dengan *sput* 3 cc yang telah berisi EDTA dan dimasukan ke tabung EDTA pada aorta sedangkan paru-paru diambil dengan menggunakan alat bedah.

Jaringan paru diambil dan ditimbang hingga 0.1g kemudian dihomogenasikan dengan *homogenizer* yang ditambahkan dapar fosfat pH 7,2 0.1 M sebanyak 1 mL hingga lumat. Homogenat disentrifugasi selama 10 menit, 5000 rpm lalu supernatan diambil dan dimasukan kedalam *microtube* bersih.

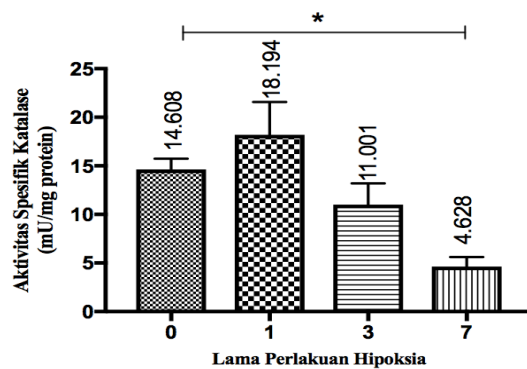
Darah disentrifugasi selama 10 menit, 5000 rpm ditandai ketinggian sampel, plasma dibuang, lalu dimasukkan dapar fosfat hingga batas. Disentrifugasi kembali dan diulang hingga sampel jernih. Pada sampel yang jernih, dapar

fosfat dibuang dan digantikan *aquabidest*. Penentuan aktivitas spesifik katalase akan menggunakan metode Mates et al¹⁷

HASIL PENELITIAN

Aktivitas spesifik katalase paru dan darah

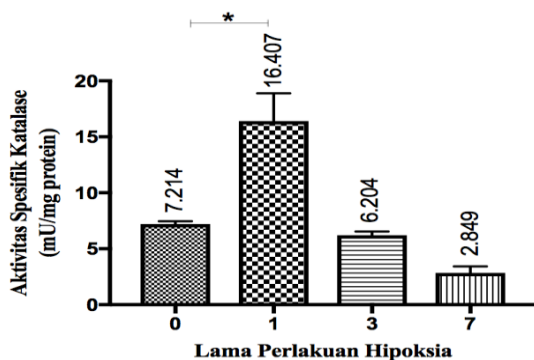
Aktivitas spesifik katalase paru dan darah memiliki puncak pada hari pertama dan menurun pada hari berikutnya. Aktivitas spesifik katalase paru dosis A memiliki puncak pada hari 1 dengan aktivitas 18,194 mU/mg protein dan terendah pada perlakuan hipoksia 7 hari yaitu 4.628 mU/mg protein (Gambar 2) dan memiliki perbedaan bermakna pada hipoksia 7 hari dibandingkan dengan kontrol (Mann-Whitney, $p < 0.05$).



Gambar 2. Diagram rata-rata aktivitas spesifik katalase paru dosis ekstrak ara 300 mg/KgBB/hari (dosis A)

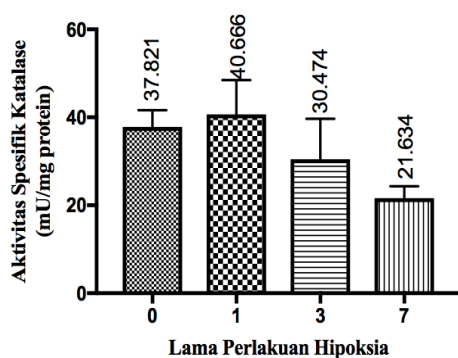
Gambar 3 memperlihatkan aktivitas spesifik katalase paru dosis B memiliki nilai tertinggi pada perlakuan hipoksia 1 hari yaitu 16.407 mU/mg protein dan

terendah pada perlakuan hipoksia 7 hari yaitu 2.849 mU/mg protein dan memiliki perbedaan bermakna pada hipoksia 1 hari dibandingkan dengan kontrol (ANOVA, $p < 0.05$).



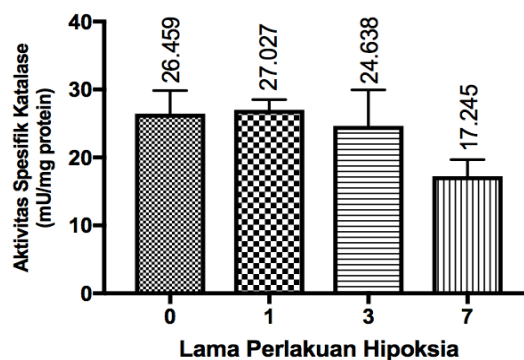
Gambar 3. Diagram rata-rata aktivitas spesifik katalase paru dosis ekstrak ara 150 mg/KgBB/hari (dosis B)

Aktivitas spesifik katalase darah dosis A dengan nilai tertinggi pada perlakuan hipoksia 1 hari yaitu 40.666 mU/mg protein dan terendah pada perlakuan hipoksia 7 hari yaitu 21.634 mU/mg protein (Gambar 4).



Gambar 4. Diagram rata-rata aktivitas spesifik katalase darah dosis ekstrak ara 300 mg/KgBB/hari (dosis A)

Aktivitas spesifik katalase darah dosis B mempunyai nilai tertinggi pada perlakuan hipoksia 1 hari yaitu 27.024 mU/mg protein dan terendah pada perlakuan hipoksia 7 hari yaitu 17.245 mU/mg protein (Gambar 5).



Gambar 5. Diagram rata-rata aktivitas spesifik katalase darah dosis ekstrak ara 150 mg/KgBB/hari (dosis B)

Korelasi Aktivitas Spesifik Katalase Paru dan Darah

Aktivitas spesifik katalase paru dosis kental (A) dan encer (B) dengan uji korelasi Pearson tidak memiliki korelasi bermakna dengan nilai p yaitu 0.1091 dan nilai R sebesar 0.7937. Aktivitas spesifik katalase darah dosis kental (A) dan encer (B) memiliki korelasi bermakna dengan nilai p yaitu 0.0453 dan nilai R yaitu 0.9844.

Aktivitas spesifik katalase paru dan darah dosis kental (A) memiliki korelasi bermakna dengan nilai p yaitu 0.0078 dan R adalah 0.9115, sedangkan aktivitas spesifik katalase paru dan darah dosis

encer (B) memiliki korelasi tidak bermakna dengan nilai p yaitu 0.2712, dan R adalah 0.5312.

PEMBAHASAN

Pada studi ini didapatkan hasil aktivitas spesifik katalase paru-paru dengan kesamaan pola grafik pada kedua kelompok dosis. Perubahan aktivitas spesifik katalase terjadi karena adanya paparan hipoksia sebagai prooksidan. Wilhelm dkk¹⁸ menuliskan terjadinya peningkatan aktivitas spesifik katalase ketika terjadi hipoksia yang meningkatkan H_2O_2 sebagai substrat. Katalase akan meningkat pada hari pertama. Hal ini terjadi akibat proses kompensasi terhadap hipoksia. Pada hari selanjutnya katalase akan mendetoksifikasi substratnya sehingga aktivitasnya menurun. Daun ara berfungsi sebagai antioksidan eksogen juga berperan dalam aktivitas spesifik katalase, daun ara yang mengandung polifenol dapat mengurangi efek dari hipoksia, sehingga semakin besar kadar yang ada maka semakin sedikit juga efek hipoksia. Pada penelitian aktivitas spesifik katalase akan menunjukkan peningkatan yang kemudian terjadi penurunan aktivitas, hasil ini sejalan dengan studi yang dilakukan Araneda dan Tuesta.¹⁹

Aktivitas spesifik katalase darah dosis A dan B memiliki korelasi yang bermakna berdasarkan uji statistik yaitu uji korelasi Pearson ($p < 0.05$) dengan $p = 0.0453$; $R = 0.9844$. Aktivitas spesifik katalase paru dan darah dosis A mempunyai korelasi yang bermakna berdasarkan pada uji statistik yaitu uji korelasi Pearson dengan $p = 0.0078$; $R = 0.9115$. Pada aktivitas spesifik katalase dosis A lebih tinggi daripada dosis B. Perbedaan aktivitas spesifik katalase ini sejalan dengan Araneda dan Tuesta¹⁹ yang menuliskan semakin banyak senyawa polifenol dapat mengurangi efek dari hipoksia sehingga katalase akan lebih tinggi pada pemberian dosis kental.

Aktivitas spesifik katalase paru dan darah pada kedua kelompok memiliki hal yang sama yaitu lebih tingginya aktivitas spesifik katalase pada darah. Hal ini sejalan dengan Halliwell dan Gutteridge yang menuliskan dalam bukunya bahwa aktivitas spesifik katalase yang lebih tinggi terdapat dalam eritrosit. Hal lain dikarenakan aktivitas spesifik darah pada penelitian ini menggunakan lisat sehingga katalase yang berada dalam eritrosit dapat diukur, dan aktivitas spesifik katalase darah akan lebih tinggi daripada aktivitas spesifik katalase paru baik kelompok A dan B.

KESIMPULAN

Terdapat perubahan aktivitas spesifik katalase paru dan darah yang diinduksi hipoksia sistemik kronik setelah diberi daun ara dosis kental maupun encer dimana aktivitas spesifik katalase naik pada lama perlakuan 1 hari dan menurun pada lama perlakuan 3 dan 7 hari. Terdapat hubungan bermakna antara aktivitas katalase paru dan darah yang dihipoksia sistemik kronik setelah diberi daun ara dosis kental dan tidak terdapat hubungan bermakna antara aktivitas katalase paru dan darah yang dihipoksia sistemik kronik setelah diberi daun ara dosis encer.

DAFTAR PUSTAKA

1. Patel DN, Goel A, Agarwal SB, Garg P, Lakhani KK. Oxygen toxicity. *JACM*. 2003 (cited 2016 Jul 4); 4(3) : 234-7. Available from: <http://medind.nic.in/jac/t03/i3/jact03i3p234.pdf>
2. Uyun HF, Indriawati R. Pengaruh Lama Hipoksia terhadap Angka Eritrosit dan Radar Hemoglobin *Rattus norvegicus*. *Mutiara Medika*. 2013 (cited 2016 Jul 4) ; 13(1) : 49-54. Available from: <http://journal.umy.ac.id/index.php/mm/article/view/1056/1140>
3. Sherwood L. *Human Physiology : From Cells to System*. 7th Ed. Belmont. USA: Brooks/Cole. 2010
4. Murkowski FH, Jackson KK, Mandsager R, Bundy TK. Hypoxia and Oxygenation. *Alaska Air Medical Escort Training Manual*. 2005 (cited 2016 Jul 4). Available from: http://dhss.alaska.gov/dph/Emergency/Documents/ems/assets/AirMedCourse/EMSF_Chapter4.pdf
5. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM et al. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 during Hypoxia. *JBC*. 2000 (cited 2016 Jul 4) ; 275(33):25130–25138. Available from: <http://www.jbc.org/content/275/33/25130.full.pdf>
6. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO journal*. 2012 (cited 2016 Jul 28) ; 5(1) : 9 - 19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923>
7. Al-Dalaen SM, Al-Qtaitat AI. Review article: Oxidative stress versus antioxidants. *j.bio*. 2014 (cited 2016 Jul 28) ; 2(5) : 60-71. Available from: <http://article.sciencepublishinggroup.com/pdf/10.11648.j.bio.20140205.11.pdf>
8. Maltepe M, Saugstad OD. Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis—Clinical Implications. *Pediatric Research*. 2009 (cited 2016 Jul 28) ; 65 (3) : 261-168. Available from: http://www.nature.com/pr/journal/v65/n3/pdf/pr200951a.pdf?origin=publication_detail
9. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012 (cited 2016 Jul 4) ; 2012 : 14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/936486>
10. Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology*. 2012 (cited 2016 Jul 28) ; 84 (5) : 581-590. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212003322>
11. Thingbaijam R, Dutta BK, Paul SB. In Vitro Antioxidant Capacity, Estimation of Total Phenolic and Flavonoid Content of *Ficus Auriculata* Lour. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012 (cited 2016 Sept 20) ; 4(4) : 518-521. Available from: <http://www.ijppsjournal.com/Vol4Issue4/4887.pdf>
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007
13. Goyal MM, Basak A. Human Catalase : looking for a complete identity. *Protein Cell*. 2010 (cited 2016 Aug 17) ; 1(10) : 888-897. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875117/>

14. Salem MZM, Salem AZM, Camacho LM, Ali HM. Antimicrobial activities and phytochemical composition of extracts of Ficus species: An overview. African Journal of Microbiology Research. 2013 (cited 2016 Sept 20) ; 7 (33) : 4207-4219. Available from: http://www.academicjournals.org/article/article1380273000_Salem%2520et%2520al.pdf
15. Shi, Y.-X., dkk. Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven Ficus species in the ethnic diet. Food Chemistry. 2011 ; 128(4).889–894
16. Federer W. Experimental design theory and application. In : Furqon A, Nurmukhlis H, Kasiman S. Stabilitas Konsentrasi Glukosa Darah Simpan Jangka Pendek Dalam Tabung Berteknologi Pemisah Jel. Pharmacia. 2015;5(2):108-114
17. Mates MJ, Perez-Gomez C, DeCastro IN. Antioxidant enzymes and human disease clinical biochemistry. 1999;32(8):595-603
18. Wilhelm J, Vankova M, Maxova H, Siskova A. Hydrogen Peroxide Production by Alveolar Macrophages Is Increased and Its Concentration Is Elevated in the Breath of Rats Exposed to Hypoxia: Relationship to Lung Lipid Peroxidation. Physiol. Res. 2003; 52. 327-332
19. Araneda OF, Tuesta M. Lung Oxidative Damage by Hypoxia. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2012 (cited 2017 Apr 19); 2012. 1-18. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/856918/>