

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Oksigen**

Oksigen dianggap sebagai “two - faced Elixir of Life” karena di satu pihak oksigen esensial bagi kehidupan dan di lain pihak dapat menyebabkan kerusakan bagi tubuh kita. Oksigen sangat penting bagi kehidupan terutama manusia sebagai makhluk hidup aerob, contohnya dapat terjadi ikatan kimia antara oksigen dan hemoglobin pada sel darah merah<sup>8</sup> Oksigen tidak berwarna dan tidak berbau dan terdapat pada kadar 20,95% di atmosfer bumi. Oksigen ditemukan pertama kali oleh John Priestley pada tahun 1720 dan Carl Wilhelm Scheele, Antoine Lavoisier sebagai “father of modern chemistry” yang pertama mengetahui peran oksigen dalam oksidasi<sup>9</sup>

Oksigen sangat penting bagi kehidupan manusia sebagai makhluk aerob. Oksigen berguna dalam mempertahankan fisiologis tubuh kita seperti mempertahankan sel, menyediakan substansi penting dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein, menjadi transport bagi seluruh senyawa-senyawa secara kimiawi, mendegradasi produk hasil ekskresi berupa toksin, membantu regulasi keseimbangan asam basa, juga meningkatkan sistem imun. Sejak cyanobacteria mulai berfotosintesis dan memperkenalkan gas oksigen yang tidak berwarna dan tidak berbau ke atmosfer bumi sekitar 2,5 miliar tahun yang lalu, evolusi manusia terkait dengan molekul kritis ini. Awalnya, sifat kimia elektrofilik dari oksigen menjadikannya sebuah tantangan bagi organisme, namun, sel eukariotik, mengikuti penggabungan mitokondria yang diturunkan dari bakteri, berevolusi untuk memanfaatkan sifat kimiawi oksigen molekuler sebagai akseptor elektron akhir dalam produksi energi seluler yang sangat efisien dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP). ATP dihasilkan melalui proses fosforilasi oksidatif yang substratnya dioksidasi oleh siklus asam trikarboksilik sehingga diproduksi kofaktor reduksi yaitu NADH dan FADH<sub>2</sub>. Setelah itu NADH dan FADH<sub>2</sub> akan memberikan electron melalui suatu kompleks protein (electron transpor chain/ETC) yang akhirnya ke akseptor terakhir yaitu oksigen. Proses ini dalam keadaan

aerob akan menghasilkan 38 ATP sedangkan anaerob hanya 2 ATP<sup>10</sup>. ATP merupakan bahan bakar bagi berbagai aktivitas manusia.

## 2.2 Hipoksia

Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen di dalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel organisme aerob, dari prokariot sampai eukariot yang kompleks, mempunyai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia baik pada tingkat sistemik maupun seluler yaitu melalui penginderaan oksigen (oxygen sensing). Contohnya, pada tingkat seluler penurunan kadar oksigen akan mengakibatkan aktivasi beberapa jalur metabolik yang tidak membutuhkan oksigen (induksi enzim glikolisis anaerob). Pada tingkat sistemik, pengaturan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan distribusi oksigen, seperti induksi eritropoiesis, angiogenesis dan hiperventilasi.

Salah satu respons sel terhadap kondisi hipoksia adalah peningkatan kadar protein Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Gen-gen yang diregulasi oleh HIF-1 di antaranya berhubungan dengan pengontrolan vasomotor (NOS2), angiogenesis (VEGF, FLT-1), pembentukan sel darah merah dan metabolisme besi, proliferasi sel, dan metabolisme energi (GLUT 1-3). Karena begitu banyaknya gen yang menjadi target dari HIF-1 ini dan sebagian besar gen merupakan gen yang vital dalam fungsional tubuh, maka faktor transkripsi ini mempunyai peranan penting terutama dalam keadaan hipoksia.

Molekul HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari sub unit  $\alpha$  dan sub unit  $\beta$  yang dikenal sebagai ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator). Sub unit  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) terdapat di dalam inti sel dan diekspresikan secara konstitutif. Oleh karena itu aktivitasnya tidak dipengaruhi kondisi hipoksia. Sedangkan sub unit  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) yang diinduksi secara khusus sebagai respons adaptasi terhadap keadaan hipoksia, dipercaya sebagai regulator utama homeostasis oksigen. Stabilitas dan aktivitas sub unit  $\alpha$  sangat dipengaruhi oleh kadar oksigen dan diatur oleh beberapa modifikasi pasca translasi. Pada keadaan normoksia, sub unit  $\alpha$  akan mengalami hidroksilasi pada residu prolin spesifik oleh HIF-prolyl hidroksilase, yang

menyebabkan terjadi ubiquitinasi sehingga sub unit  $\alpha$  tersebut didegradasi oleh proteasom. Sebaliknya dalam keadaan hipoksia, hambatan hidroksilasi residu prolin akan menyebabkan HIF-1 $\alpha$  stabil sehingga meningkatkan aktivitasnya sebagai faktor transkripsi gen-gen yang diregulasi oleh keadaan hipoksia. Dengan demikian, aktivitas HIF-1 dalam homeostasis oksigen sangat ditentukan oleh sub unit  $\alpha$ , yang dipertahankan dalam keadaan hipoksia dan didegradasi dalam keadaan normoksia. Di samping itu, pada penelitian Shao dilaporkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada hipoksia yang akut.

Hipoksia telah dibuktikan merupakan tahap penting dalam perkembangan patogenesis berbagai penyakit degeneratif khususnya yang disebabkan karena iskemia, diantaranya adalah infark miokard pada jantung, stroke pada otak, kanker, penyakit paru obstruktif kronik dan gagal ginjal akut. Oleh karena itu, informasi mengenai ekspresi HIF-1 $\alpha$  sebagai respons adaptasi sel pada keadaan hipoksia sangat diperlukan untuk memperbaiki penatalaksanaan penyakit-penyakit tersebut. Walaupun telah dilaporkan bahwa stabilitas dan ekspresi HIF-1 $\alpha$  selama hipoksia meningkat nyata dibandingkan pada keadaan normoksia, namun belum ada data yang membandingkan pola peningkatan tersebut pada berbagai jaringan terutama jaringan yang penting seperti jantung. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan pada penatalaksanaan hipoksia sistemik pada penyakit infark miokard pada jantung.<sup>11</sup>

### **2.3 Reactive Oxygen Species (ROS)**

Reactive Oxygen Species (ROS) diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme seluler, terutama di mitokondria. Ketika produksi seluler ROS mengontrol kapasitas antioksidan, kerusakan makromolekul seluler seperti lipid, protein, dan DNA dapat terjadi. Keadaan seperti "stres oksidatif" dianggap berkontribusi pada patogenesis sejumlah penyakit manusia termasuk yang berasal dari jantung. Studi terbaru juga melibatkan ROS yang dihasilkan oleh oksidasi membran plasma khusus dalam sinyal fisiologis normal oleh faktor pertumbuhan dan sitokin.<sup>12</sup>

Semua organisme multiseluler bergantung pada jaringan yang sangat kompleks dari kedua sinyal ekstraseluler dan intraseluler untuk mengatur komunikasi sel-sel dalam berbagai proses fisiologis seperti organogenesis perkembangan, pemeliharaan homeostasis jaringan normal, dan memperbaiki respons terhadap cedera jaringan. Biasanya, sinyal ekstraseluler terdiri dari faktor pertumbuhan, sitokin, hormon, dan neurotransmitter yang berikatan dengan reseptor permukaan sel spesifik. Interaksi reseptor-ligan ini kemudian menghasilkan berbagai jenis sinyal intraseluler yang mungkin melibatkan perubahan konsentrasi ion (reseptor terkait-saluran ion), aktivasi protein pengikat GTP pengikat trimerik (reseptor G protein-coupled), dan aktivasi reseptor kinase (enzim reseptor -linked). Sinyal hilir kemudian diteruskan oleh pembawa pesan kedua (seperti cAMP, Ca<sup>2+</sup>, dan metabolit fosfolipid) dan oleh kaskade fosforilasi protein. Pada akhirnya, jalur sinyal intraseluler ini mengarah pada aktivasi faktor transkripsi yang mengatur ekspresi set gen spesifik yang penting untuk fungsi seluler yang beragam.

Molekul oksigen (dioksigen, O<sub>2</sub>) sangat penting untuk kelangsungan hidup semua organisme aerobik. Metabolisme energi aerobik bergantung pada fosforilasi oksidatif, suatu proses di mana energi oksidoreduksi transpor elektron mitokondria (melalui kompleks enzim dehidrogenase NADH multikomponen) diubah menjadi ikatan fosfat berenergi tinggi ATP. O<sub>2</sub> berfungsi sebagai akseptor elektron akhir untuk cytochrome-c oxidase, komponen enzimatik terminal dari kompleks enzimatik mitokondria ini, yang mengkatalisis reduksi O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O menjadi empat elektron. Metabolisme O<sub>2</sub> yang sebagian direduksi dan sangat reaktif dapat terbentuk selama reaksi transfer elektron (dan lainnya) ini. Metabolit O<sub>2</sub> ini termasuk anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-·</sup>) dan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), yang dibentuk oleh reduksi O<sub>2</sub> satu dan dua elektron, masing-masing. Dengan adanya ion logam transisi, radikal hidroksil yang lebih reaktif (OH<sup>·</sup>) dapat terbentuk. Metabolit O<sub>2</sub> yang sebagian direduksi ini sering disebut sebagai "spesies oksigen reaktif" (ROS) karena reaktifitasnya yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan O<sub>2</sub> molekuler.

ROS dari mitokondria dan sumber seluler lainnya secara tradisional dianggap sebagai produk sampingan beracun dari metabolisme dengan potensi

menyebabkan kerusakan pada lipid, protein, dan DNA (78). Untuk melindungi terhadap efek ROS yang berpotensi merusak, sel memiliki beberapa enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (yang mengurangi  $O_2^- \cdot$  menjadi  $H_2O_2$ ), katalase, dan glutathione peroxidase (yang mengurangi  $H_2O_2$  hingga  $H_2O$ ). Jadi stress oksidatif dapat secara luas didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara produksi oksidan dan kapasitas antioksidan sel untuk mencegah cedera oksidatif. Stres oksidatif telah terlibat dalam sejumlah besar penyakit manusia termasuk aterosklerosis, fibrosis paru, kanker, penyakit neurodegeneratif, dan penuaan. Namun hubungan antara stres oksidatif dan patobiologi penyakit ini tidak jelas, sebagian besar karena kurangnya pemahaman tentang mekanisme dimana fungsi ROS dalam keadaan fisiologis dan penyakit normal.

Beberapa bukti menunjukkan bahwa ROS tidak hanya berbahaya oleh produk metabolisme seluler tetapi juga peserta penting dalam sinyal dan regulasi sel. Meskipun peran ini untuk ROS adalah konsep yang relatif baru pada vertebrata, ada bukti kuat peran fisiologis untuk ROS dalam beberapa sistem nonmamalia. Pada bakteri, protein OxyR berfungsi sebagai pengatur transkripsi gen yang diinduksi  $H_2O_2$  dan telah ditunjukkan untuk langsung diaktifkan oleh oksidasi. Sebuah studi baru-baru ini telah menunjukkan bahwa  $H_2O_2$  mengoksidasi dua sistein yang dilestarikan di OxyR untuk membentuk ikatan disulfida intramolekul yang memicu aktivasi faktor transkripsi ini, mungkin dengan mengubah konformasi. Faktor transkripsi *Escherichia coli* SoxR diaktifkan secara khusus sebagai respons terhadap  $O_2^-$  menghasilkan agen redoks-bersepeda seperti paraquat dan menadione. *Activated SoxR* memediasi transkripsi gen SoxS, menghasilkan peningkatan protein SoxS yang kemudian mengaktifkan transkripsi beberapa gen lain termasuk superoxide dismutase (SOD). SoxR adalah homodimer yang mengandung dua pusat redox-active iron-sulfur [2Fe-2S] yang sensitif terhadap oksidasi oleh  $O_2^-$ . Pusat-pusat sulfur besi SoxR harus dalam keadaan teroksidasi agar mereka menjadi aktif secara transkripsional sehingga memberikan mekanisme yang masuk akal dimana  $O_2^-$  mengirimkan sinyal regulasi gennya. Dalam sel tumbuhan, generasi  $H_2O_2$  dalam menanggapi berbagai patogen

memunculkan kematian sel terlokalisir untuk membatasi penyebaran patogen dan respon yang lebih sistemik yang melibatkan induksi gen pertahanan yang mengatur kekebalan tanaman. Dalam landak laut, pemupukan memicu produksi ekstraseluler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh oksidasi membran plasma dengan pelepasan ovoperoxidase simultan. Peroksidase atau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-katalis-silang protein ekstraseluler kemudian membentuk amplop pelindung di sekitar oosit yang baru dibuahi.

Paradoks yang terlihat dalam peran ROS sebagai biomolekul penting dalam pengaturan fungsi seluler dan sebagai produk sampingan beracun dari metabolisme mungkin, setidaknya sebagian, terkait dengan perbedaan konsentrasi ROS yang dihasilkan. Ini analog dengan efek nitrit oksida (NO), yang memiliki fungsi regulasi dan efek sitotoksik tergantung pada sumber enzimatik dan jumlah relatif NO yang dihasilkan. NO berfungsi sebagai molekul pemberi sinyal yang memediasi vasodilatasi ketika diproduksi dalam konsentrasi rendah oleh isoform konstitutif nitric oxide synthase (NOS) dalam sel-sel endotel vaskular dan sebagai sumber oksidan sangat beracun yang digunakan untuk pembunuhan mikrobisida ketika diproduksi dalam konsentrasi tinggi oleh NOS yang diinduksi dalam makrofag. Memang, semua sel fagositik memiliki membran oksidase plasma yang berfungsi baik O<sub>2</sub><sup>-</sup> untuk menghasilkan sejumlah besar ROS yang diperlukan untuk fungsinya dalam pertahanan tuan rumah. Dalam ulasan ini, kami memeriksa bukti adanya oksidasi membran plasma yang sama yang menghasilkan jumlah ROS yang lebih rendah dalam sel nonfagositik untuk tujuan pensinyalan dan pengaturan sel. Kami meringkas efek sel dari berbagai interaksi ligan-reseptor yang telah terbukti menghasilkan ROS intraseluler atau ekstraseluler. Konsep yang muncul pada mekanisme dimana ROS dapat berfungsi sebagai molekul pensinyalan dibahas. Untuk keperluan tinjauan ini, kami fokus terutama pada efek seluler dari produksi ROS yang dimediasi oleh ligan (endogen) daripada pada efek stres oksidatif eksogen. Juga, peran NO<sup>·</sup> sebagai molekul pemberi sinyal tidak dibahas di sini kecuali dalam konteks kemampuannya untuk berinteraksi dengan dan memodulasi O<sub>2</sub><sup>-</sup> · memberi sinyal.<sup>13</sup>

## 2.4 Jantung

Pasokan oksigen yang konstan sangat diperlukan untuk viabilitas dan fungsi jantung. Namun, peran oksigen dan proses terkait oksigen di jantung adalah kompleks, dan mereka dapat bermanfaat atau berkontribusi terhadap disfungsi jantung dan kematian. Karena oksigen adalah penentu utama ekspresi gen jantung, dan peserta penting dalam pembentukan ROS dan banyak proses seluler lainnya, pertimbangan perannya dalam jantung sangat penting dalam memahami patogenesis disfungsi jantung.

Jantung mamalia adalah organ aerob obligat. Pada denyut nadi istirahat, jantung mengkonsumsi sekitar 8–15 ml O<sub>2</sub> / mnt / 100 g jaringan. Ini secara signifikan lebih dari yang dikonsumsi oleh otak (sekitar 3 ml O<sub>2</sub> / min / 100 g jaringan) dan dapat meningkat menjadi lebih dari 70 ml O<sub>2</sub> / min / 100 g jaringan miokard selama latihan yang kuat. Otot jantung mamalia tidak dapat menghasilkan energi yang cukup di bawah kondisi anaerobik untuk mempertahankan proses seluler yang penting; dengan demikian, pasokan oksigen yang konstan sangat diperlukan untuk mempertahankan fungsi jantung dan kelangsungan hidup. Namun, kisah oksigen di jantung itu rumit, dan melampaui perannya dalam metabolisme energi.

Oksigen merupakan penentu utama ekspresi gen miokardial, dan ketika kadar O<sub>2</sub> miokard menurun, baik selama hipoksia terisolasi atau hipoksia terkait iskemia, pola ekspresi gen di jantung secara signifikan diubah. Oksigen berpartisipasi dalam pembentukan NO, yang memainkan peran penting dalam menentukan tonus pembuluh darah, kontraktilitas jantung, dan berbagai parameter tambahan. Oksigen juga penting dalam pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS), yang dapat berpartisipasi sebagai molekul yang baik hati dalam proses pemberian sinyal sel atau dapat menyebabkan kerusakan sel dan kematian yang tidak dapat diperbaiki. Oksigen dengan demikian baik vital dan merusak.

Jantung dapat memanfaatkan berbagai bahan bakar metabolik, termasuk asam lemak, glukosa, laktat, keton, dan asam amino. Dalam keadaan makan, asam lemak adalah bahan bakar pilihan, terhitung hingga 90% dari total asetil-CoA yang

diberikan ke mitokondria jantung. Asam lemak dimetabolisme oleh  $\beta$ -oksidasi, menghasilkan asetil-KoA, NADH, dan FADH<sub>2</sub>. Asetil-CoA memasuki siklus Krebs, menghasilkan lebih banyak NADH dan FADH<sub>2</sub>. Glukosa dimetabolisme awalnya melalui jalur glikolitik, menghasilkan jumlah ATP yang relatif kecil dan juga piruvat, yang memasuki siklus Krebs, menghasilkan NADH dan FADH<sub>2</sub>. Dengan tidak adanya oksigen, jumlah total energi yang dihasilkan oleh proses ini tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan jantung. Kebutuhan energi jantung terpenuhi, bagaimanapun, dengan masuknya NADH dan FADH<sub>2</sub> yang dihasilkan ke dalam rantai transpor elektron, yang menghasilkan ATP oleh fosforilasi oksidatif di mitokondria. Oksigen berfungsi sebagai akseptor elektron terminal dalam rantai transpor elektron, dan tanpa adanya oksigen yang cukup, transport elektron berhenti dan kebutuhan energi jantung tidak terpenuhi.

ROS dapat dibentuk di jantung oleh berbagai mekanisme, termasuk generasi selama fosforilasi oksidatif di mitokondria sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik seluler normal. Dengan demikian, proses utama dari mana jantung memperoleh energi yang cukup juga dapat menghasilkan produksi ROS. Setiap atom oksigen mengandung 2 elektron tak berpasangan di kulit terluarnya. Atom atau molekul dengan elektron yang tidak berpasangan adalah radikal bebas yang ditunjuk dan merupakan entitas yang sangat reaktif yang dapat dengan mudah berpartisipasi dalam berbagai reaksi kimia / biokimia. Molekul oksigen, O<sub>2</sub>, ditandai sebagai diradikal, suatu sifat yang memungkinkan oksigen cair tertarik ke kutub magnet. Properti ini juga menentukan bahwa pengurangan penuh oksigen ke air sebagai peristiwa terminal dalam rantai transpor elektron membutuhkan 4 elektron. Sumbangan sekuensial elektron ke oksigen selama proses ini dapat menghasilkan ROS sebagai perantara, dan "kebocoran elektron" juga dapat berkontribusi pada pembentukan ROS. Sumbangan satu elektron ke oksigen molekuler menghasilkan pembentukan radikal superoksida (O<sub>2</sub> • -). Sumbangan elektron kedua menghasilkan peroksida, yang kemudian mengalami protonasi untuk menghasilkan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sumbangan elektron ketiga, seperti yang terjadi pada reaksi Fenton (Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>3+</sup> + •OH + OH<sup>-</sup>), menghasilkan produksi radikal hidroksil yang sangat reaktif (•OH). Akhirnya,



sumbangan elektron keempat menghasilkan air. Oksigen singlet ( $^1O_2$ ), bentuk oksigen molekular yang sangat singkat dan reaktif di mana elektron terluar dinaikkan ke keadaan energi yang lebih tinggi, dapat dibentuk oleh berbagai mekanisme, termasuk reaksi Haber-Weiss ( $H_2O_2 + O_2 \cdot^- \rightarrow \cdot OH + OH^- + ^1O_2$ ).

ROS dapat dibentuk di jantung, dan jaringan lain, dengan beberapa mekanisme; mereka dapat diproduksi oleh xanthine oxidase (XO), NAD (P) H oxidase, cytochrome P450; oleh autooksidasi katekolamin; dan dengan pelepasan NO sintase (NOS). NO mengandung elektron yang tidak berpasangan, dan dalam kondisi tertentu dapat bereaksi dengan  $O_2 \cdot^-$  untuk membentuk peroxynitrite ( $ONOO \cdot^-$ ), oksidan kuat. Pembentukan ROS di jantung dapat disebabkan oleh aksi sitokin dan faktor pertumbuhan juga. Angiotensin II (ATII), PDGF, dan TNF- $\alpha$ , misalnya, dapat menginduksi pembentukan  $H_2O_2$  dan  $O_2$  melalui aktivasi oksidase NAD (P) H. Jalur N-dependent (P) H-dependent ini paling baik dijelaskan dalam sel-sel otot polos pembuluh darah tetapi juga telah didokumentasikan dalam tipe-tipe sel lain, termasuk cardiomyocytes. Sejumlah ligan tambahan telah dikaitkan dengan induksi ROS, termasuk beberapa dengan relevansi khusus dengan sistem kardiovaskular.

Ada beberapa mekanisme seluler yang mengimbangi produksi ROS, termasuk jalur enzimatik dan nonenzimatik. Di antara jalur enzimatik yang terbaik adalah katalase dan glutathione peroksidase, yang mengoordinasikan katalisasi  $H_2O_2$  ke air, dan superoksida dismutase (SOD), yang memfasilitasi pembentukan  $H_2O_2$  dari  $O_2 \cdot^-$ . Thioredoxin dan reduktase thioredoxin bersama-sama membentuk tambahan enzimatik antioksidan dan sistem regulasi redoks yang telah terlibat dalam berbagai macam proses yang berhubungan dengan ROS. Thioredoxin dan reduktase thioredoxin dapat mengkatalisis regenerasi banyak molekul antioksidan, termasuk ubiquinone (Q10), asam lipoic, dan asam askorbat, dan dengan demikian merupakan pertahanan antioksidan penting terhadap ROS. Penghapusan reduktase thioredoxin menghasilkan kelainan jantung perkembangan dan kematian jantung sekunder akibat kardiomiopati dilatasi berat.

Mekanisme nonenzymatic termasuk antioksidan intraseluler seperti vitamin E, C, dan  $\beta$ -karoten (prekursor vitamin A), ubiquinone, asam lipoic, dan urat. Mereka juga termasuk glutathione, yang bertindak sebagai substrat pereduksi untuk aktivitas enzimatik glutathione peroxidase. Sejumlah besar penelitian in vitro dan hewan telah menunjukkan aktivasi ROS dalam sistem kardiovaskular sebagai respons terhadap berbagai stresor dan pada gagal jantung. Lebih lanjut, meskipun hasilnya agak tidak konsisten, penelitian pada hewan juga telah menunjukkan bahwa antioksidan dan jalur pertahanan ROS dapat memperbaiki kelainan jantung yang diperantarai ROS. Banyak proses biologis yang dimediasi ROS yang berhubungan erat dengan jantung dan pada asal-usul gagal jantung telah dijelaskan.<sup>14</sup>

## **2.5 Superoxide Dismutase (SOD)**

Superoxide Dismutase (SOD) pertama kali diisolasi dari darah sapi sebagai protein tembaga hijau (Mann dan Keilin) yang biologisnya fungsi itu diyakini sebagai penyimpanan tembaga. Di atas tahun, enzim telah secara bervariasi disebut sebagai erythrocytase, indophenol oxidase, dan tetrazolium oxidase. Itu fungsi katalitik enzim ditemukan oleh McCord dan Fridovich. Enzimnya ada dimana-mana, secara luas didistribusikan di antara organisme pengonsumsi O<sub>2</sub>, anaerob aerotolerant, dan beberapa anaerob obligat (Fridovich). All SOD, terlepas dari sumbernya, adalah metaloprotein multimeric yang sangat efisien dalam mengais superoksida radikal. Cu / ZnSOD, serta MnSOD paling prokariotik dan FeSODs, bersifat dimeric, sedangkan MnSODs dari mitokondria dan bakteri termofilik tertentu bersifat tetramerik. SOD mengkatalisis reaksi yang tidak proporsional dengan laju sangat dekat dengan difusi (McCord dan Fridovich). Untuk mencapai reaksi ini, mekanisme menggunakan bolak-balik reduksi / oksidasi dari masing-masing logam terkait dengan enzim.

Tiga jenis SOD yang berbeda, berdasarkan pada ion logam di situs aktif mereka, telah diamati dari berbagai organisme diperiksa. Jadi, ada SOD yang mengandung tembaga dan seng (Cu / ZnSOD), mangan (MnSOD), atau besi (FeSOD). Dengan beberapa pengecualian, Cu / ZnSODs umumnya ditemukan di sitosol sel eukariotik

dan kloroplas; MnSODs ditemukan dalam matriks mitokondria dan prokariota; FeSODs umumnya ditemukan di prokariota dan telah dilaporkan ada di beberapa tanaman (Duke dan Salin). Sebuah membran terkait MnSOD telah dilaporkan dalam kloroplas dari beberapa tanaman (Hayakawa *et al*), dan tetrameric glycosylated Cu / ZnSOD telah dilaporkan dalam cairan ekstraseluler mamalia (Marklund) tidak ada SOD ekstraseluler yang dilaporkan pada tumbuhan.

Saat ini, asal-usul evolusi dari berbagai SOD tidak jelas. Namun, data sekuens menunjukkan bahwa ketiganya jenis SOD jatuh ke dalam dua keluarga filogenetik, Cu / ZnSOD dan Fe-MnSODs. The FeSODs dan MnSODs terkait erat karena mereka berbagi tingkat tinggi amino urutan asam dan homologi struktural, tetapi tidak berhubungan untuk Cu / ZnSODs (Stallings *et al*). Data yang tersedia menunjukkan bahwa dua keluarga dari SOD pasti telah berevolusi secara mandiri dan dipilih sebagai tanggapan terhadap suatu kesamaan tekanan lingkungan, oksigenasi dari biosfer oleh organisme fotosintetik.

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa di kedua prokariota dan eukariota, stres oksidatif menginduksi atau meningkatkan aktivitas SOD (Bowler *et al*). Peningkatan aktivitas SOD telah diamati dalam menanggapi pengobatan dengan herbisida yang berfungsi sebagai disukai akseptor elektron terminal di situs pengurangan PSI (misalnya diquat, paraquat) atau yang diketahui memblokir electron transportasi (misalnya atrazine, diuron). Suhu dan kondisi cahaya mengarah ke sunscald dalam sayuran, buah, dan bunga menyebabkan peningkatan kadar SOD (Rabinowitch dan Sklan). Peningkatan SOD telah diamati sebagai respons terhadap ozon dan SO<sub>2</sub>. Selain itu, kondisi lingkungan seperti itu seperti kekeringan, kedinginan, anoxia, dan cedera patogenik berkorelasi dengan aktivitas SOD (Monk *et al*). Pohon poplar terkena kadar SO yang relatif rendah, terbukti lebih tahan kerusakan berikutnya pada paparan tingkat tinggi SO<sub>2</sub>, itu peningkatan resistensi berkorelasi dengan peningkatan aktivitas SOD (Tanaka dan Sugahara). Varietas tahan-paraku dari berbagai spesies termasuk tembakau, *ryegrass*, dan *horseweed* berkorelasi dengan peningkatan aktivitas SOD dan enzim antioksidan lainnya (Harper dan Harvey). Namun, mekanisme untuk diamati peningkatan

enzim antioksidan dalam menanggapi stres oksidatif belum terselesaikan. SOD jagung sistem gen-enzim, terdiri dari setidaknya enam secara genetik dan biokimia isozim yang berbeda (Scandalios), disediakan kesempatan untuk mempelajari respon isozim spesifik SOD gen untuk tekanan lingkungan yang dipaksakan. Perubahan individu gen SOD dalam menanggapi tekanan lingkungan itu belum diperiksa secara rinci, juga tidak memiliki tanggapan yang berbeda faktor stres dalam sistem multienzim SOD tunggal telah dipelajari sebelumnya.

Data yang tersedia dari 11 organisme menunjukkan bahwa SOD mengais-ngais O<sub>2</sub> - in vivo seperti yang mereka lakukan secara in vitro dan melindungi mereka melawan efek merusak aktif O<sub>2</sub>. Peran pelindung SOD pada bakteri telah didukung oleh penelitian yang menggunakan berbagai mutan (Touati). Baru-baru ini, percobaan transgenik menunjukkan bahwa SOD dari tanaman dapat efektif digunakan untuk menyelamatkan ragi SOD-kekurangan di bawah stres oksidatif.

Mengingat data saat ini, tampaknya masuk akal untuk menyimpulkan bahwa SOD memainkan peran penting dalam melindungi sel-sel hidup terhadap toksisitas dan mutagenisitas spesies O<sub>2</sub> aktif oleh kebajikan kapasitas mereka untuk mengais-ngais O<sub>2</sub>-. Jelas bahwa sel-sel hidup harus menjaga keseimbangan yang baik antara tingkat O<sub>2</sub><sup>-</sup> generasi dan penghapusan.<sup>15</sup>

## **2.6 Daun *Blackberry***

*Blackberry* merupakan buah yang dapat dimakan diproduksi oleh beberapa spesies dalam genus *Rubus* dari suku *Rosaceae*. Buah ini sebenarnya bukanlah merupakan *berry*, secara botani itu disebut buah agregat, terdiri dari *drupelet* kecil. *Blackberry* dan *raspberry* juga disebut *caneberries* atau semak berduri. Ini adalah kelompok besar, dan dikenal lebih dari 375 spesies, banyak yang berhubungan erat dengan mikrospecies apomiktis asli di seluruh belahan bumi utara iklim sedang dan Amerika Selatan.

Kingdom: *Plantae*

Ordo: *Rosales*

Famili: *Rosaceae*

Genus: *Rubus*

Subgenus: *Rubus*

Buah dan daun dari kultivar berbeda dari *blackberry* duri (*Rubus sp.*), *Raspberry* merah (*Rubus idaeus L.*), *black raspberry* (*Rubus occidentalis L.*), dan stroberi (*Fragaria × ananassa D.*) tanaman dianalisis untuk kapasitas antioksidan total (kapasitas absorbansi radikal oksigen, ORAC) dan total konten fenolik. Selain itu, buah dianalisis untuk kandungan antosianin total. *Blackberry* dan stroberi memiliki nilai ORAC tertinggi selama tahap hijau, sedangkan *raspberry* merah aktivitas ORAC tertinggi pada tahap matang. Total kandungan antosianin meningkat dengan kematangan untuk ketiga spesies buah-buahan. Dibandingkan dengan buah-buahan, daun ditemukan memiliki nilai ORAC yang lebih tinggi. Di buah-buahan, nilai ORAC berkisar 7,8-33,7  $\mu\text{mol}$  setara Trolox (TE) / g buah segar (35,0-162,1  $\mu\text{mol}$  TE / g bahan kering), sedangkan pada daun, nilai ORAC berkisar antara 69,7 hingga 182,2  $\mu\text{mol}$  TE / g daun segar (205,0-728,8  $\mu\text{mol}$  TE / g bahan kering). Sebagai daun menjadi lebih tua, yang Nilai ORAC dan total konten fenolik menurun. Hasilnya menunjukkan korelasi linier antara kandungan fenolik total dan aktivitas ORAC untuk buah dan daun. Untuk buah beri matang, hubungan linier ada antara nilai ORAC dan konten antosianin. Dari buah matang yang diuji, atas dasar berat basah buah, *Jewel black raspberry* dan *blackberry* mungkin adalah sumber terkaya antioksidan. Atas dasar berat kering buah, stroberi memiliki aktivitas ORAC tertinggi diikuti oleh *raspberry* hitam, *blackberry*, dan *raspberry* merah.

Antioksidan alami terjadi di semua bagian tanaman. Antioksidan ini termasuk karotenoid, vitamin, fenol, flavonoid, glutathionine diet, dan endogen metabolit (Larson). Antioksidan yang berasal dari tumbuhan telah terbukti berfungsi sebagai singlet dan triplet pemadam oksigen, pemulung radikal bebas, peroksida dekomposer, penghambat enzim, dan sinergis (Larson).

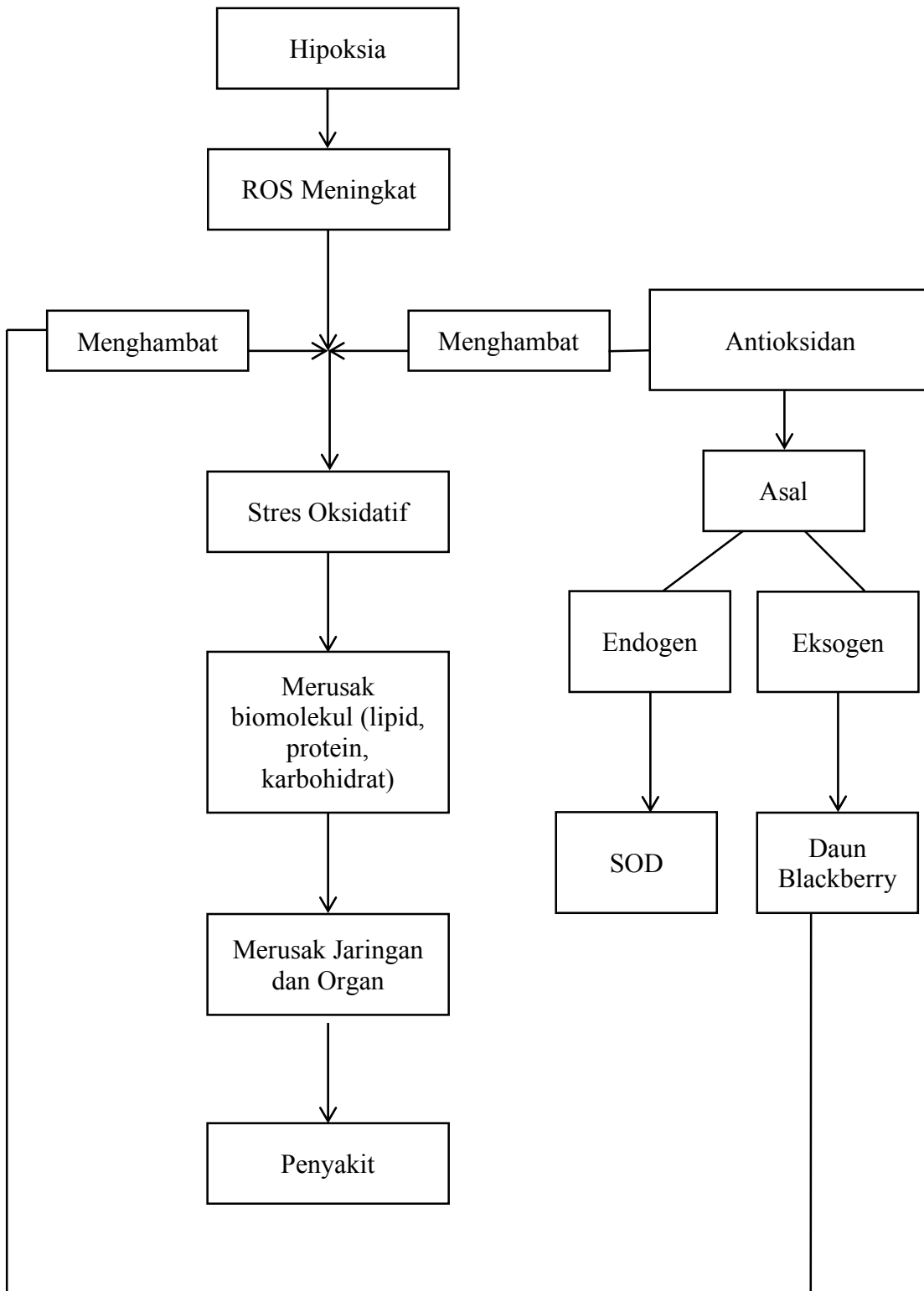
Buah-buahan dan sayuran mengandung banyak antioksidan yang berbeda komponen (Cao *et al*; Velioglu *et al*; Wang *et al*). Konsumsi buah-buahan dan sayuran telah dikaitkan dengan insiden rendah dan tingkat kematian kanker (Ames *et al*; Dragsted *et al*; Willett) dan penyakit jantung (Verlangieri *et al*). Makan buah dan sayuran juga berkurang tekanan darah, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, mendetoksifikasi kontaminan dan polutan, dan mengurangi peradangan (Ascherio *et al*; Sacks dan Kass).

Fitokimia dalam jaringan tanaman bertanggung jawab atas kapasitas antioksidan sebagian besar dapat dikaitkan dengan fenolat, anthocyanin, dan senyawa flavonoid lainnya (Cao *et al*). Sebelum ditemukan berbeda kapasitas antioksidan dalam berbagai spesies dan kultivar dari *Vaccinium*. Meningkatkan kematangan *blueberry* di panen menghasilkan antioksidan yang lebih tinggi, antosianin, dan isi fenolik total (Prior *et al*). Namun, sedikit informasi tersedia pada kapasitas antioksidan dalam daun dan buah dari tanaman berry lainnya di berbagai tahap perkembangan. Investigasi ini dievaluasi kapasitas antioksidan dalam genotipe yang berbeda dan tahap perkembangan buah dan daun tanaman *blackberry*, *raspberry*, dan stroberi.

*Blackberry*, *raspberry*, dan stroberi, sebagai tambahan untuk nutrisi seperti vitamin dan mineral, juga kaya *anthocyanin*, flavonoid, dan asam fenolik (Heinonen *et al*; Rice-Evans dan Miller; Wang *et al*). Buah berry itu terbukti efektif dalam menghambat oksidasi manusia densitas rendah lipoprotein, yang mungkin memiliki potensi efek kesehatan (Heinonen *et al*).

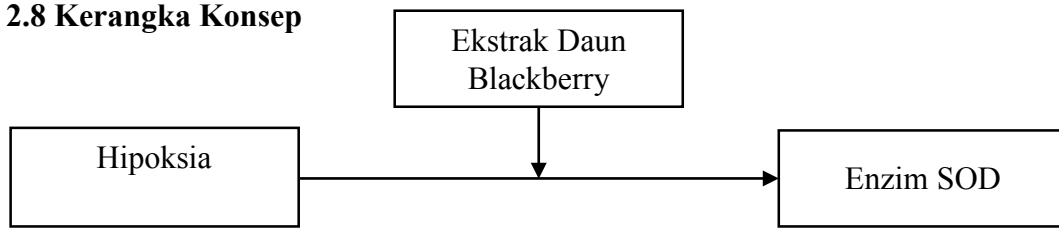
Antosianin mungkin adalah kelompok fenolik terbesar senyawa dalam makanan manusia, dan asupan harian antosianin pada manusia telah diperkirakan sebagai sebanyak 180-215 mg / hari di Amerika Serikat. Melengkapi buah beri ini dengan seimbang diet bisa lebih efektif dan ekonomis daripada mengkonsumsi antioksidan individu seperti asam askorbat atau vitamin A atau E dalam melindungi tubuh melawan berbagai tekanan oksidatif. Evans dan Miller menyatakan bahwa potensi antioksidan total buah dan sayuran lebih penting daripada tingkat individu konstituen antioksidan spesifik.<sup>16</sup>

## 2.7 Kerangka Teori



**Gambar 2.10** Gambar Kerangka Teori

## 2.8 Kerangka Konsep



**Gambar 2.11 Gambar Kerangka Konsep**