

KADAR LOGAM SENG PLASMA DAN ALKOHOL DEHIDROGENASE PADA TIKUS YANG DIBERI ETANOL

Elfrida Magdalena Manurung^{1*}, Ida Bagus Putra Manuaba¹, Anak Agung Bawa Putra¹

¹*Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

*E-mail: elfridamagdalen23@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui kadar logam seng plasma alkohol dehidrogenase pada tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL. Rancangan penelitian ini menggunakan *Randomized Posttest Only Control Group* Desain dengan dua kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol. Rata-rata kadar logam seng plasma pada tikus kontrol (K) dan tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL (P₁) dan 3 mL (P₂) adalah 445,83 ± 27,76 mg/L; 928,38 ± 183,13 mg/L; dan 1228,75 ± 80,00 mg/L. Hasil perhitungan rata-rata aktivitas alkohol dehidrogenase plasma pada tikus kontrol dan tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL adalah 21,00 ± 0,34 ng/mL; 18,69 ± 0,31 ng/mL dan 17,05 ± 0,33 ng/mL. Hasil ANOVA menunjukkan p < 0,05 sehingga terdapat perbedaan bermakna kadar logam seng plasma dan aktivitas alkohol dehidrogenase pada tikus kontrol dan tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL. Hasil analisis *Tukey/HSD* untuk kadar rata-rata logam seng plasma tikus kontrol dan tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL memiliki perbedaan signifikan, yaitu terjadinya peningkatan kadar logam seng plasma dan pada aktivitas alkohol dehidrogenase dengan terjadi penurunan pada kelompok tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL terhadap tikus kontrol.

Kata kunci: etanol, plasma darah tikus, alkohol dehidrogenase, kadar total logam seng, dan aktivitas alkohol dehidrogenase

ABSTRACT

This study aims to determine the levels of plasma zinc alcohol dehydrogenase in mice fed with 2 mL and 3 mL of 40% ethanol. The design of this study using Randomized Posttest Only Control Group Design with two treatment groups and one control group. The average plasma zinc levels in control mice (K) and mice fed with 2 mL (P₁) and 3 mL (P₂) of 40% ethanol were 445.83 ± 27.76 mg / L; 928.38 ± 183.13 mg / L; and 1228.75 ± 80 mg / L respectively. The average alcohol dehydrogenase activity of plasma in K, P₁, and P₂ mice were 21.00 ± 0.34 ng/mL; 18.69 ± 0.31 ng/mL and 17.05 ± 0.33 ng/mL respectively. ANOVA results of p < 0.05 indicating that there are significant differences in the levels of plasma zinc metal and alcohol dehydrogenase activity in control (K) and in treated (P₁ and P₂) mice. The results of the Tukey / HSD analysis for the average levels of plasma zinc metal indicated a significant difference showed by increase in plasma levels of zinc metal and decrease in the alcohol dehydrogenase activity in treated groups (P₁ and P₂).

Keywords: Ethanol, Rat blood plasma, alcohol dehydrogenase, total levels of metal zinc and Alcohol dehydrogenase activity

PENDAHULUAN

Kasus kematian akibat overdosis minuman beralkohol di Indonesia menjadi masalah yang perlu perhatian dari pemerintah dalam penanggulangannya (Panjaitan, 2003). Etanol dari minuman beralkohol di dalam tubuh akan mengalami biotransformasi yang melibatkan tiga jalur, yaitu: (1) jalur lintas alkohol dehidrogenase (sitosol) merupakan jalur utama metabolisme etanol. Etanol di dalam tubuh dikonversi menjadi asetaldehid dengan alkohol dehidrogenase untuk

mengkatalisir pelepasan ion hidrogen dari etanol dan berikatan dengan kofaktor NAD⁺ membentuk NADH (Katzung, 2007), (2) Jalur *Microsomal Ethanol Oxidizing System* (MEOS) yakni proses metabolisme etanol jika konsentrasi etanol dalam darah < 100 mg/dL. Sistem MEOS mengkonversi asetaldehid menjadi asam asetat oleh aldehyd dehidrogenase di dalam mitokondria (Wright, 1991), dan (3) Jalur peroksisom atau sistem katalase yakni metabolisme H₂O₂ yang dapat mengubah keadaan redoks dengan perubahan metabolisme lemak dan karbohidrat ketika kadar etanol

meningkat di dalam tubuh sehingga menghambat sintesis protein dengan menambah jaringan kolagen (Zakhari, 2006).

Konsumsi etanol dapat meningkatkan kadar logam seng plasma dan menurunkan aktivitas alkohol dehidrogenase di dalam tubuh (Aquino, *et al.*, 2011). Overdosis etanol dapat menurunkan kadar logam seng plasma dan meningkatkan aktivitas alkohol dehidrogenase. Penelitian ini diharapkan terjadi peningkatan kadar logam seng plasma dan penurunan aktivitas alkohol dehidrogenase yang diberi etanol. Logam seng adalah situs aktif alkohol

dehidrogenase sehingga dilakukan penentuan kadar logam seng untuk mengetahui kerja hati mengkonversi etanol menjadi asetaldehid. Pemberian suplemen yang mengandung logam seng akan dapat menormalkan kembali kadar logam seng plasma darah sehingga kasus keracunan minuman beralkohol dapat diatasi,

MATERI DAN BAHAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah tikus, etanol 96 %, H₂O₂ pekat, HNO₃ 70 %, H₂SO₄ 96 %, buffer fosfat pH 7, EDTA, NaH₂PO₄.2H₂O, Na₂HPO₄.2H₂O, dan reagen KIT MAK053-1KT Sigma – Aldrich

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, pipet tetes, pipet volume, pipet mikro, batang pengaduk, gelas beker, gelas ukur, corong, *hot plate*, tabung *ependorff*, *water bath gelmar science*, pipet kapiler hemotokrit, *sprit* injeksi, sentrifugasi *clements 2000*, spektrofotometer UV-Vis *Varint DMS 80*, dan *Inductivity Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICPE) 9000 Series Shimadzu*.

Cara Kerja

Penyiapan hewan uji

Hewan uji diadaptasi selama satu minggu sebelum pengambilan sampel darah tikus. Tikus ditempatkan pada kandang yang berukuran 30 x 30 x 20 cm³. Adaptasi dilakukan pada tikus kontrol dan perlakuan dengan penyeragaman makanan dengan pemberian pakan standar dan air minum lalu tikus dialokasi menjadi tiga kelompok. Kelompok kontrol dengan 3 tikus dan kelompok perlakuan dengan 4 ekor tikus dan siap untuk dilakukan pengambilan sampel darah.

Pengambilan sampel plasma darah tikus

Sampel plasma darah tikus diambil di Desa Nyalian, Banjarangkan - Klungkung pada tanggal 23 Maret 2016. Plasma darah diambil sebanyak ± 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung *ependorff* yang berisi EDTA sebagai anti koagulan. Dilakukan analisis kadar logam seng dan aktivitas alkohol dehidrogenase tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL.

Penentuan kurva kalibrasi pada larutan standar ZnSO₄.7H₂O

ZnSO₄.7H₂O sebanyak 0,2198 g dilarutkan dengan HNO₃ 1 M hingga volume 500 mL sehingga didapatkan larutan standar ZnSO₄.7H₂O 100 ppm. Sebanyak 0 µL, 250 µL, 500 µL dan 750 µL larutan ZnSO₄.7H₂O 100 ppm diambil untuk membuat larutan standar 0 ppb, 250 ppb, 500 ppb dan 750 ppb diencerkan dengan HNO₃ 0,1 M. Larutan ini digunakan sebagai penentuan kurva kalibrasi logam seng.

Penentuan kadar logam seng plasma tikus

Plasma darah sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam gelas beker 100 mL ditambahkan dengan larutan HNO₃ 37 %, H₂SO₄ 96 %, dan H₂O₂ (6 : 2 : 1). Campuran tersebut didestruksi di atas *hotplate* selama 5 menit pada suhu 100°C. Larutan hasil destruksi dimasukkan dalam labu ukur 25 mL lalu diencerkan dengan akuades. Dianalisis dengan menggunakan ICPE sehingga dihasilkan nilai intensitas sebagai kadar logam seng plasma tikus yang diberi etanol dan juga tikus kontrol.

Penentuan aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus

Aktivitas alkohol dehidrogenase diukur dengan menggunakan Assay KIT MAK053-1KT Sigma-Aldrich. Sampel plasma darah sebanyak 10 μL diambil dan dimasukkan ke dalam *plate well* lalu ditambahkan 2 μL larutan kontrol positif dan *buffer ADH assay* hingga volume menjadi 50 μL . Campuran tersebut ditambahkan 100 μL larutan *Mix Reaction* dan 100 μL larutan *Background Control* untuk setiap sampel. Setiap sampel pada *plate well* diinkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C dengan pembacaan *microplate well* dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengukur nilai *optical density* pada $\lambda = 450$ (OD₄₅₀) dan inkubasi dilakukan selama 30 menit hingga 2 jam pada suhu 37°C. Nilai *optical density* pada $\lambda = 450$ (OD₄₅₀) inilah yang digunakan untuk mendapatkan hasil dari aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus.

Analisis data hasil penelitian

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik. Jika distribusi data normal dan homogen dengan $p < 0,05$ maka analisis dilanjutkan dengan analisis parametrik metode ANOVA menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Services Solution*) pada tingkat kepercayaan 95 %. Pengambilan keputusan didasarkan pada nilai statistik hitung dan nilai statistik tabel. Jika $p > 0,05$ mengandung normal kembali dengan maka H_0 diterima dan H_1 ditolak, sebaliknya jika $p < 0,05$ maka H_1 diterima dan H_0 ditolak.

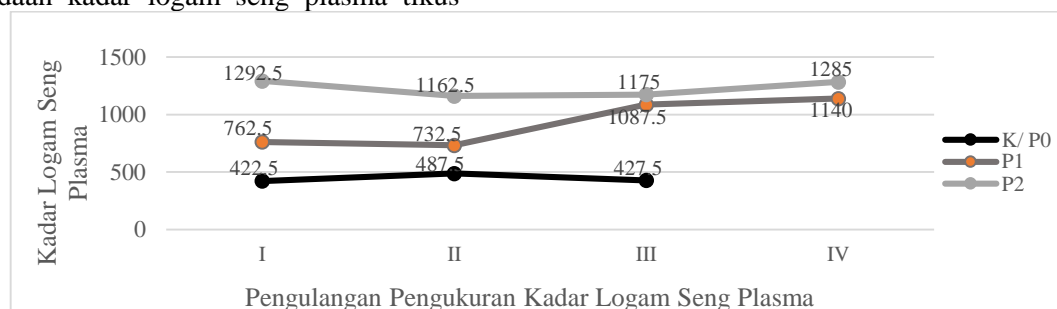
HASIL DAN PEMBAHASAN

Persamaan regresi linear untuk kurva kalibrasi logam seng adalah $y = 0,86x + 117$ dengan koefisien regresi (R) sebesar 0,9980. Pengukuran kadar logam seng plasma tikus kontrol dan tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL ditunjukkan pada Gambar 1. Perbedaan kadar logam seng plasma tikus

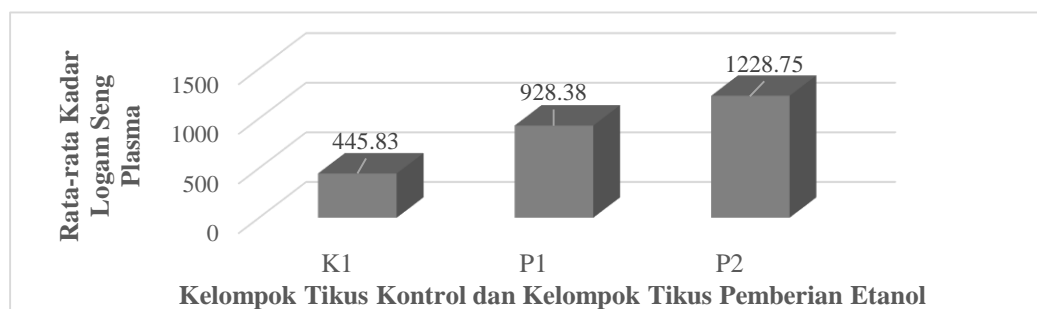
kontrol karena darah yang mengalir ke organ hati, jantung, dan lambung untuk setiap tikus berbeda. Jumlah dan kecepatan darah yang mengalir ke hati di dalam tubuh selama proses peredaran darah menyebabkan adanya perbedaan jumlah aliran darah yang mengalir di organ tubuh tikus kontrol. Semakin besar volume dan jumlah darah maka darah yang mengalir ke hati semakin besar (Lienhardt, *et al.*, 2005).

Tikus yang diberi etanol 40 % dengan variasi volume 2 mL dan 3 mL menghasilkan variasi kadar logam seng. Banyaknya volume etanol yang diberikan akan mempengaruhi jumlah kadar logam seng yang dihasilkan. Semakin banyak volume etanol yang diberikan maka etanol yang diserap akan semakin cepat dan banyak sehingga kadar etanol meningkat. Dengan meningkatnya kadar etanol maka kadar logam seng plasma juga meningkat. Peningkatan kadar logam seng plasma sebanding dengan meningkatnya alkohol dehidrogenase di dalam tubuh yang berfungsi dalam metabolisme etanol. Kadar logam seng plasma tikus yang diberi etanol 40 % dapat ditunjukkan pada Gambar 1. Kadar logam seng plasma pada tikus yang diberi etanol 40% dengan volume sebanyak 3 mL lebih besar jika dibandingkan dengan tikus yang diberi etanol sebanyak 2 mL.

Pemberian etanol yang semakin banyak menyebabkan terjadinya proses penyerapan dan metabolisme etanol semakin cepat di dalam tubuh tikus sehingga kadar logam seng yang dihasilkan juga semakin banyak (Marchitti, *et al.*, 2008). Semakin besar tubuh tikus maka semakin banyak kandungan air di dalam tubuh tikus karena hampir dua per tiga dari berat badan tikus terdiri dari air. Tingginya kandungan air menyebabkan konsentrasi etanol darah berkurang sehingga proses penyerapan etanol menjadi lebih cepat yang menyebabkan terjadi peningkatan kadar etanol dan kadar logam seng plasma didalam tubuh (Koivisto H., 2007).



Gambar 1. Kadar Logam Seng Plasma Tikus Kontrol dan Tikus yang diberi Etanol 40 %



Gambar 2. Rata-rata Kadar Logam Seng Plasma Tikus Kontrol dan Tikus yang diberi Etanol 40 %

Gambar 2 menunjukkan rata-rata kadar logam seng tikus kontrol dan tikus yang diberi etanol. Kadar yang diberi etanol 40 % sebanyak 3 mL (P₂) sebesar 1228,75 ± 80,00 mg/L dan standar deviasi 1228,75 ± 85,17 mg/L ; tikus yang diberi etanol 40 % sebanyak 2 mL (P₁) sebesar 928,38 ± 183,13 mg/L dan standar deviasi sebesar 928,38 ± 260,76 mg/L dan tikus kontrol (K₁) sebesar 445,83 ± 27,76 mg/L dan standar deviasi sebesar 445,83 ± 36,1. Metabolisme etanol melibatkan alkohol dehidrogenase pada proses oksidasi menjadi asetaldehid. Alkohol dehidrogenase memiliki situs aktif berupa logam seng. Logam seng di dalam darah akan membentuk kompleks dengan kofaktor NAD⁺ sehingga logam seng akan berikatan dengan satu kofaktor NAD⁺ menjadi NADH. Jadi semakin banyak jumlah etanol yang diberikan akan menyebabkan peningkatan pada kadar logam seng plasma di dalam darah (Hoek and Pastorino, 2004)

Analisis Data Hasil Kadar Logam Seng Plasma Tikus

Data dianalisis ANOVA dengan SPSS kadar logam seng plasma pada tikus kontrol dan diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL. Tabel 1 menunjukkan nilai $p < 0,05$ maka H₁ diterima. Hal ini menyatakan adanya perbedaan yang signifikan dengan terjadinya peningkatan kadar logam seng plasma tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume etanol 3 mL dan 2 mL terhadap tikus kontrol. Uji *Post Hoc Study* dengan uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa perbedaan yang bermakna pada kadar logam

seng plasma tikus kontrol dan diberi tikus yang diberi etanol memberikan nilai perbedaan yang paling signifikan pada kelompok tikus dengan pemberian etanol 40 %. Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan kadar logam seng plasma tikus yang diberi etanol dibandingkan pada tikus kontrol.

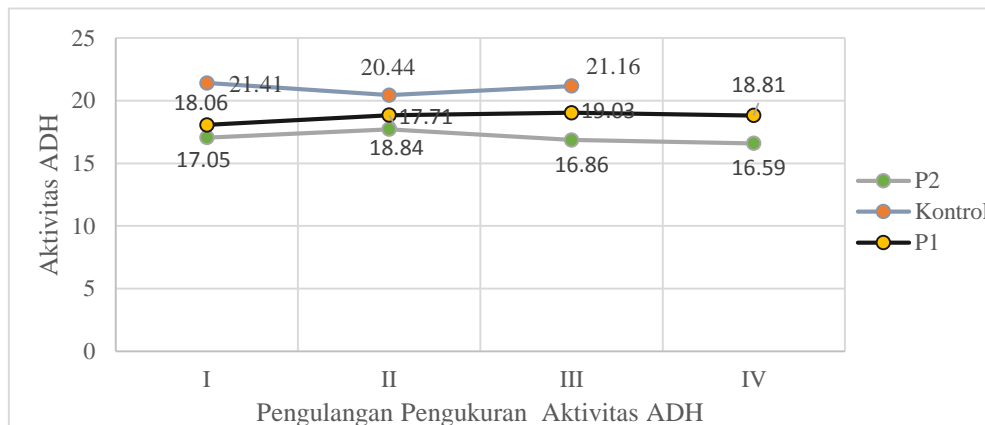
Penentuan dari aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus

Gambar 3 menunjukkan aktivitas alkohol dehidrogenase tikus yang diberi etanol 40 % sebanyak 3 mL (P₂) sebesar 17,05 ± 0,33 ng/mL dan standar deviasi sebesar 17,05 ± 0,48 ng/mL; kelompok tikus yang diberi etanol 40 % sebanyak 2 mL (P₁) sebesar 18,69 ± 0,41 ng/mL dan standar deviasi sebesar 18,69 ± 0,43 ng/mL pada kelompok tikus kontrol (K₁) dengan sebesar 21,00 ± 0,34 ng/mL dan standar deviasi sebesar 21,00 ± 0,44 ng/mL sehingga tingkat kesalahan pengerjaan penelitian berkisar 0,02 - 0,10 ng/mL

Volume etanol yang diberikan semakin banyak pada tikus maka meningkatkan kadar logam seng plasma dan menurunkan aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus yang diberi etanol karena dalam proses metabolisme etanol terjadi peningkatan kadar ADH. Hal ini mengakibatkan reaksi sempurna etanol menjadi asetaldehid. Pada umumnya hasil pemberian etanol secara akut pada tikus dapat meningkatkan kadar ADH sebagai marker kerusakan awal pada hati tikus (Marchitti, *et al.*, 2008).

Tabel 1. Analisis ANOVA dengan SPSS untuk Kadar Logam Seng Plasma Tikus Kontrol dan Tikus Diberi Etanol 40 % dengan Volume 2 mL dan 3 mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1054348,532	2	527174,266	27,548	0,000
Within Groups	153090,104	8	19136,263		
Total	1207438,636	10			



Gambar 3. Aktivitas Alkohol Dehidrogenase pada Tikus Kontrol dan Tikus yang diberi Etanol 40 %

Tubuh memproduksi enzim ADH yang mengubah etanol menjadi asetaldehid dan mengubah asetaldehid menjadi asetat (Hoek *et al.*, 2004; Lieber, 2005; Moon *et al.*, 2007). Enzim ADH berperan dalam toleransi dan ketergantungan etanol baik pemecahan etanol menjadi asetaldehid dan asetaldehid menjadi asetat yang tidak beracun (Seitz, *et al.*, 2001).

Keadaan mukosa lambung dan usus juga mempengaruhi proses penyerapan etanol di dalam tubuh tikus. Adanya jenis makanan tertentu dalam lambung saat dilakukan pemberian etanol mempengaruhi proses penyerapan etanol di dalam tubuh. Jumlah etanol yang diserap tergantung pada seberapa cepat lambung mampu mengosongkan isinya. Jika tikus yang diberi etanol diberi makan maka kecepatan etanol untuk diserap tubuh menjadi tiga kali lebih lambat daripada saat lambung yang kosong (Hoek and Pastorino, 2004).

Analisis Hasil Aktivitas Alkohol Dehidrogenase Plasma Tikus Wistar

Tabel 2 menunjukkan adanya penurunan aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus yang diberi etanol. Pemberian etanol pada tikus memberikan pengaruh secara nyata ($P < 0,05$) maka nilai $p < 0,05$ maka H_1 diterima untuk hasil

one way anova. Dengan nilai H_1 yang diterima maka plasma darah tikus kontrol dan perlakuan menyatakan adanya perbedaan yang bermakna pada setiap aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus dalam menurunkan aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus yang diberi etanol.

Penurunan aktivitas alkohol dehidrogenase dengan signifikan adalah tikus yang diberi etanol 40 % sebanyak 3 mL (P_2) dengan simpangan rata-rata sebesar $17,05 \pm 0,33$ dan standar deviasi adalah $17,05 \pm 0,48$; kelompok tikus yang diberi etanol 40 % sebanyak 2 mL (P_1) dengan simpangan rata-rata $18,69 \pm 0,41$ dan standar deviasi sebesar $18,69 \pm 0,43$ pada kelompok tikus kontrol (K_1) dengan simpangan rata-rata sebesar $21,00 \pm 0,34$ dan standar deviasi sebesar $21,00 \pm 0,44$. Hasil uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang bermakna pada aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus kontrol dan kelompok perlakuan pemberian etanol dengan nilai perbedaan paling signifikan pada kelompok tikus dengan pemberian etanol 40 %. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL dibandingkan dengan tikus kontrol.

Tabel 2. Data ANOVA dengan SPSS Untuk Aktivitas Alkohol Dehidrogenase Plasma Tikus Kontrol dan Tikus yang Diberi Etanol 40 % dengan Volume 2 mL dan 3 mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26,768	2	13,384	61,541	0,000
Within Groups	1,740	8	0,217		
Total	28,508	10			

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka dapat ditarik simpulan sebagai berikut :

1. Kadar logam seng plasma meningkat dengan pemberian etanol 40 % sebanyak 2 mL dan 3 mL
2. Aktivitas alkohol dehidrogenase plasma tikus menurun dengan pemberian etanol 40 % sebanyak volume 2 mL dan 3 mL.

Saran

Dalam penelitian ini perlu dilakukan pengukuran berat badan tikus sebagai satu parameter terkendali dalam penentuan kadar logam seng plasma darah. Pengambilan darah tikus tidak dilakukan pemberian pakan dan air minum dalam penentuan kadar logam seng plasma darah yang diberi etanol 40 % dengan volume 2 mL dan 3 mL

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dewa Raka yang telah membantu dalam proses pengambilan sampel plasma darah tikus dan yang telah memberikan pengetahuan dan teknik - teknik dalam pengambilan sampel darah tikus pada aorta tikus.

DAFTAR PUSTAKA

Aquino, N., Forti, C.J., Zucolotto, V., Ciancaglioni, P., and De Andrade, R.A., 2011, The Kinetic Behavior of Dehydrogenase Enzymes in Solution and Immobilized onto Nanostructured Carbon Platforms, *Process Biochemistry*, 46(11) : 2347-2352

Hoek, J.B and Pastorino. J.G., 2004, Cellular Signaling Mechanisms in Alcohol-Induced Liver Damage, *Semin. Liv. Dis.* 24: 257-272

Katzung, B.G., 2007, *Basic and Clinical Pharmacology ed 10th*, The McGraw-Hill Companies, Inc, USA

Lienhardt, C., Fielding, K., Silah, J.S., Bah, B., Gustafon, P., and Worndorff, D., Investigation of the Risk Factors for Tuberculosis: A Case - Control Study in Three Countries in West Africa, *Int J Epidemiol* 2005(34): 914-923

Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos. D., and Vasiliou. V., 2008. Non-P450 Aldehyde Oxidizing Enzymes: The Aldehyde Dehydrogenase Superfamily, *Expert Opin, Drug Metab, Toxicol*, 4(7): 697-720.

Moon, K., Abdelmegeed. M.A., and Song B., 2007, Inactivation of Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase via Nitrosylation in Ethanol Exposed Rat Liver, *FEBS Lett*, 21(5): 3967-3972.

Panjaitan dan Ruqiah Ganda Putri., 2003, *Bahaya Gagal Hamil yang diakibatkan Minuman Beralkohol.*, Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.

Seitz, H.K., Matsuzaki. S., Yokohama. A., Hormann. N., Vakevainen. S., and Wang Xian Dong., 2001, *Alcohol and Cancer. Alcoholisme: Clin. Exp. Res.* 25: 137-143s.

Wright H., 1991, *Effect of Alcohol on the Male Reproductive System*, Alcohol Health & Research World Spring.

Zakhari Samir., 2006, *Overview: How is Alcohol Metabolized by the Body*, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) 5635, Fisher Lane, MSC 9304 Be