

ANALISIS 8-ISOPROSTAN DALAM URIN TIKUS JANTAN WISTAR SETELAH TERPAPAR ETANOL DAN ASAP ROKOK

Agung Ari Chandra Wibawa, Ni Made Suaniti, dan Ni Komang Ariati

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

Senyawa 8-isoprostan sebagai senyawa penanda stres oksidatif, dapat terbentuk akibat reaksi peroksidasi lemak berupa asam arakhidonat dengan radikal bebas dalam tubuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis 8-isoprostan dalam urin tikus jantan Wistar setelah terpapar etanol dan asap rokok secara sub akut. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksifase padat dan analisisnya dilanjutkan dengan kombinasi antara KLT dan spektrofotodensitometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis senyawa 8-Isoprostan dalam urin tikus jantan Wistar sebagai tikus kontrol dan perlakuan rokok tidak menunjukkan adanya 8-isoprostan. Analisis selanjutnya menunjukkan terdeteksi ada senyawa 8-isoprostan pada perlakuan etanol dan kombinasi etanol-rokok dengan konsentrasi rata-rata berturut-turut adalah $1,519 \pm 1,386$ ppm dan $2,063 \pm 1,308$ ppm.

Kata kunci: 8-isoprostan, Asam arakhidonat, KLT, Spektrofotodensitometri

ABSTRACT

The 8-isoprostane compound can be used for a biomarker of oxidative stress formed by lipid peroxidation in the form of arachidonic acid with free radical in the body. The purpose of this study was to analysis urinary 8-isoprostane in male Wistar rats after sub-acute exposure to ethanol and cigarette smoke. Extraction method used was solid phase extraction and the analysis was conducted by TLC and spectrophotodensitometry. The results showed that the 8-isoprostane compound was not detected in the male Wistar rat's urine as control rats and in those exposed to cigarette smoke. The average concentrations of 8-Isoprostane in the male Wistar rat's urine exposed to ethanol and combination of ethanol-cigarette were $1.519 \pm 1,386$ and $2.063 \pm 1,308$ ppm respectively.

Keywords: 8-isoprostane, Arachidonic acid, TLC, Spectrophotodensitometry

PENDAHULUAN

Kemajuan teknologi dan ilmu pengetahuan berdampak pada gaya hidup masyarakat yang sering mengonsumsi etanol dan rokok. Metabolisme etanol di dalam hati menyebabkan peningkatan jumlah radikal bebas dalam tubuh (Chamulitrat, *et al.*, 1998). Begitu juga pada rokok kandungan zat kimia yang dominan pada rokok adalah nikotin. Nikotin merupakan senyawa organik yang terkandung dalam daun tembakau. Selain nikotin kandungan tar di dalamnya memiliki 4 jenis radikal bebas. Salah satu radikal

bebas yang menonjol adalah semiquinon (Oktavianis, 2011)

Radikal bebas (*free radical*) adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya, bersifat sangat reaktif, dengan cara menyerang dan mengikat atau menarik elektronmolekul yang berada di sekitarnya (Hardianty, 2011). Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan pada senyawa-senyawa biomolekul seperti karbohidrat, protein, lipid, dan DNA (Saleh, 2002).

Kelebihan radikal bebas dibandingkan dengan antioksidan di dalam tubuh akan menyebabkan keadaan yang disebut stres oksidatif (Hardianty, 2011). Terjadinya stres oksidatif dalam tubuh dapat terdeteksi dari adanya senyawa-senyawa penanda stres oksidatif, salah satunya adalah 8-isoprostan. Senyawa 8-isoprostan dapat dianalisis pada cairan biologis berupa plasma darah dan urin yang sering digunakan sebagai sampel (Ogino dan Wang, 2007). Senyawa 8-isoprostan adalah senyawa prostaglandin yang terbentuk melalui katalisis peroksidasi dari asam arakhidonat (Montuschi, 2000). Metode yang sering digunakan dalam menganalisis senyawa 8-isoprostan yaitu ELISA, LC-MS, dan kromatografi lapis tipis (Ogino dan Wang, 2007).

Metode KLT-Spektrofotodensitometri merupakan metode yang telah digunakan dalam menganalisis 8-isoprostan khususnya dalam sampel berupa urin. Metode ini memiliki pengerjaan yang sederhana, tidak membutuhkan waktu yang cukup lama, dan biaya yang digunakan relatif murah (Gandjar dan Rohman, 2012). Maka pada penelitian ini digunakan metode KLT-Spektrofotodensitometri untuk menganalisis senyawa 8-isoprostan dalam urin.

Berdasarkan latar belakang di atas telah dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi 8-Isoprostan yang terkandung dalam urin tikus Wistar dan dapat memberikan manfaat mampu menganalisis analisis 8-isoprostan dalam sampel cairan biologis.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan standar 8-isoprotan, etanol 99%, methanol (p.a), HCl, heksana (p.a), etil asetat (p.a), kloroform (p.a), asam asetat (p.a), aquades. Bahan biologi yang digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini yaitu tikus jantan Wista.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus lengkap dengan wadah khusus penampung urin, sarung tangan, sonde 1,0 mL, timbangan analitik 9010A electronic charging scale, aerator nipoon 198, gelas ukur, gelas beker,

pipet volume, pipet 1000 μ L, pipet 25 μ L, tabung reaksi, labu ukur 100 mL, cartridge C₁₈ 3 ml, bejana SPE, cawan, vakum, bejana elusi, botol vial, HPTLC, mini syringe 100 μ L, penotol otomatis camag linomat IV, TLC-scanner camag 3.

Cara Kerja

Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu, kontrol, etanol, rokok, dan etanol-rokok. Pengulangan yang dilakukan sebanyak 6 kali, sehingga total hewan uji yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus. Pemberian perlakuan etanol dilakukan dengan menggunakan alat bantu sonde 1 ml. Sedangkan pemberian asap rokok dilakukan dengan menggunakan alat aerator agar rokok tetap mengeluarkan asap.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel urin dilakukan pada hari terakhir yaitu pada hari ke-16 setelah pemberian perlakuan pada kelompok kontrol, etanol, rokok, dan etanol rokok selama 15 hari. Pada hari terakhir perlakuan tikus dimasukkan kedalam kandang yang telah berisi penampung urin, dan ditampung selama 12 jam. Sampel yang telah terkumpul disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C sebelum dianalisis.

SPE (Solid Phase Extraction)

Sampel urin setiap perlakuan dikondisikan pada pH < 4 dengan cara menambahkan 1 M HCl. Cartridge C₁₈ dikondisikan dengan 3 mL metanol diikuti dengan 3 ml akuades. Kemudian sampel urin dimasukkan dalam cartridge, dicuci dengan 3 mL akuades dan 3 ml heksana. Senyawa 8-isoprostan dielusi dengan 3 mL etil asetat 1% metanol ditampung dalam cawan dan dievaporasi di ruang asam. Sampel kering selanjutnya dilarutkan dalam 500 μ L 95% etanol dan langsung dilakukan analisis penentuan konsentrasi 8-isoprostan.

Uji Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi MERC. Masing-masing urin sampel dan standar 8-isoprostan 1 ppm ditotolkan sebanyak 50 μ L secara otomatis. Kemudian plat dielusi dengan fase gerak kloroform : metanol : akuades : asam

asetat dengan perbandingan 86 : 14 : 0,8 : 1. Hasil dari uji kualitatif adalah berupa nilai Rf.

Uji Kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan dengan spektrofotodensitometer pada panjang gelombang 234 nm. Hasil yang didapatkan berupa luas puncak, untuk perhitungan konsentrasi 8-isoprostan dalam sampel urin dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

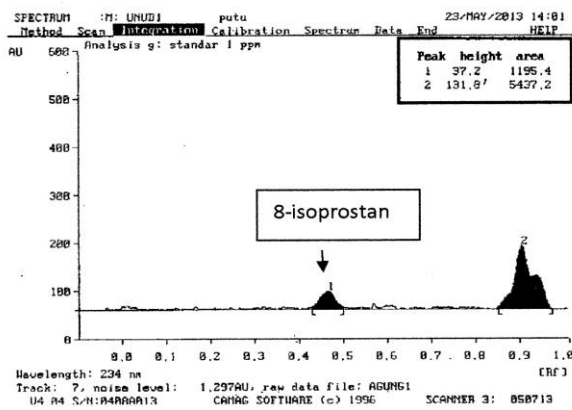
Keterangan :

- C_s = Konsentrasi standar
- A_s = Area standar
- C_x = Konsentrasi sampel
- A_x = Area sampel.

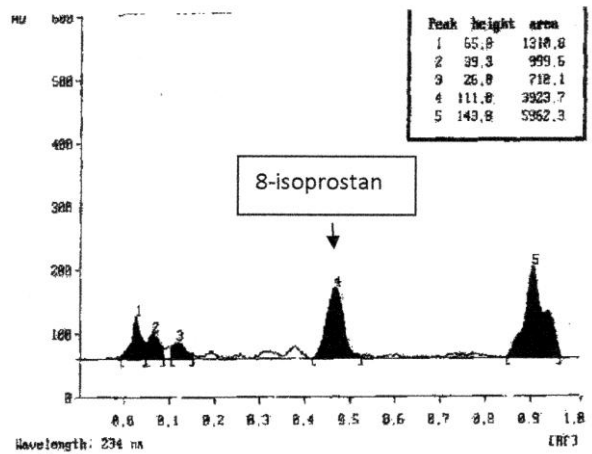
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Kualitatif

Hasil uji kualitatif didapatkan pada sampel urin tikus, senyawa 8-isoprostan ditemukan pada kelompok perlakuan etanol dan kombinasi etanol rokok yang ditunjukkan dengan nilai Rf sampel yang mendekati nilai Rf standar, sedangkan pada perlakuan kontrol dan rokok tidak menunjukkan adanya senyawa 8-isoprostan. Berikut gambar spektra standar 8-isoprostan dan spektra urin sampel perlakuan kombinasi etanol-rokok.



Gambar 1. Spektra standar 8-isoprostan 1 ppm



Gambar 2. Spektra sampel urin tikus kombinasi etanol-rokok

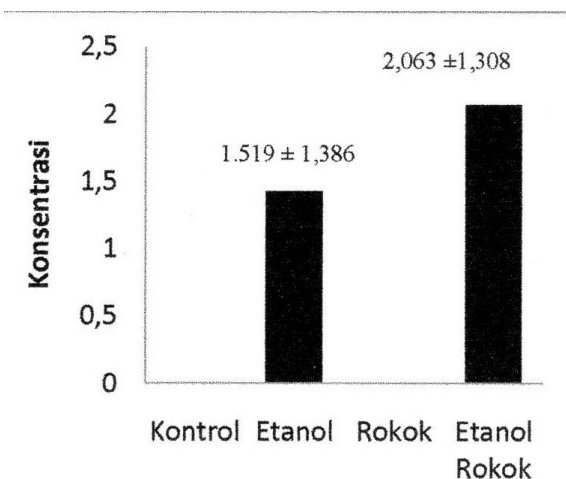
Berdasarkan spektradiatas didapatkan nilai Rf standar 8-isoprostan dengan konsentrasi 1 ppm sebesar 0,4. Sedangkan nilai Rf pada spektra urin tikus didapatkan nilai Rf yang mendekati dengan standar 8-isoprostan. Hasil ini didukung penelitian sebelumnya oleh Imbusch dan Mueller pada tahun 2000 yang menyatakan nilai Rf dari 8-isoprostan dengan fase gerak yang sama adalah 0,51.

Hasil Uji Kuantitatif

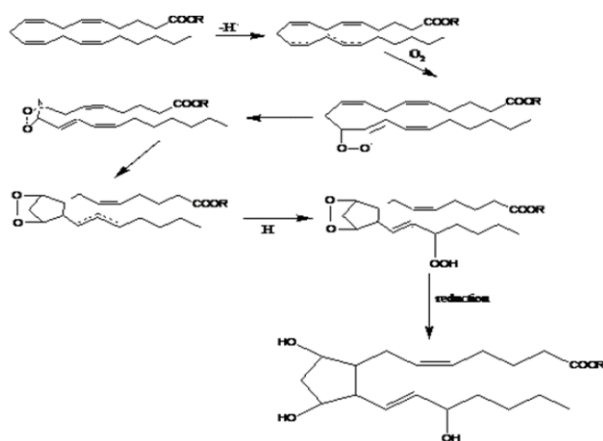
Hasil uji kuantitatif didapatkan luas puncak 8-isoprostan 1 ppm sebesar 1195,4. Spektrofotodensitometer bekerja secara serapan atau fluorosensi. Bercak yang diukur dengan sistem fluorosensi dapat lebih teliti daripada bercak yang disemprot dengan pereaksi warna. Konsentrasi rata-rata 8-isoprostan dalam urin tikus perlakuan etanol dan kombinasi etanol-rokok sebesar 1,519 ± 1,386 dan 2,063 ± 1,308. Data konsentrasi 8-isoprostan dari masing-masing perlakuan ditunjukkan pada Gambar 3.

Senyawa 8-isoprostan dihasilkan dari peroksidasi lipid yang berupa asam arakhidonat oleh radikal bebas. Proses pembentukan radikal bebas oleh etanol memiliki banyak proses dan faktor didalam tubuh. Menurut Agarwal dan Prabakaran 2005, salah satu produk sampingan dari etanol yaitu asetaldehidakan berinteraksi dengan protein dan lipid membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam tubuh. Hal ini didukung juga oleh Defeng dan Arthur 2003, metabolisme alkohol dibagi menjadi 2 tahap, yang pertama alkohol dehidrogenase mengubah alkohol menjadi asetaldehid, molekul yang reaktif dan bersifat

toksik. Kemudian aldehiddehidrogenase mengubah asetaldehid menjadi asam asetat. Tiap reaksi ini membentuk molekul NADH yang merupakan bahan awal dari pembentukan ROS. Pada asap rokok dapat membentuk ROS, yang berasal dari fase gas dan tar sehingga menghasilkan radikal superoksida ($O_2^{\bullet-}$) dan radikal hidroksi ($\bullet OH$) (Toornet *al.*, 2009). Berikut merupakan mekanisme pembentukan 8-isoprostan.



Gambar 3. Diagram batang konsentrasi 8-isoprostan pada berbagai perlakuan



Gambar 4. Mekanisme pembentukan 8-isoprostan (Christie, 2011)

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Senyawa 8-isoprostan ditemukan pada sampel urin perlakuan etanol dan etanol rokok, sedangkan sampel urin perlakuan kontrol dan rokok tidak ditemukan senyawa 8-isoprostan. Konsentrasi 8-isoprostan dalam sampel urin pada perlakuan etanol sebanyak $1,519 \pm 1,386$ ppm, dan pada perlakuan etanol rokok sebanyak $2,063 \pm 1,308$ ppm.

Saran

Perlu dilakukan analisis 8-isoprostan dengan dosis waktu perlakuan lebih lama dan pengambilan sampel dalam cairan biologis lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para penguji Dr. Drs. Manuntun Manurung, M.S., Drs. I Wayan Suirta, M.Si., dan Dr. Irdhawati, S.Si., M.Si., serta kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. dan Prabakaran, S. A., 2005, Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology, *Indian Journal of Experimental Biology*, 43
- Chamulitrat, W., Carnal, J., Nicole, M., and Spitzer, J.J., 1998, Radical Generation In Vivo Endotoxin Enhances Biliary Ethanol-Dependent free, *Department of Physiology and the Alcohol Research Center Louisiana State University Medical Center New Orleans Louisiana*, G653 : 0193-1857
- Christie, William W, 2011, *Isoprostanes Chemistry and Biology*, AOCS, Invergowrie
- Hardianty, D., 2011, Pemberian Ekstrak Propolis Peroral Menurunkan Konsentrasi F₂-Isoprostan dalam Urin Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Jantan Yang Mengalami Aktivitas Fisik Maksimal, *Tesis*, Universitas Udayana, Denpasar

- Imbush, R., dan Mueller, M.J., 2000, Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducibile DinorIsoprostanesF1(PhytoptostanesF1) in Plants, *Plants Physiology*, 1293-1303
- Montuschi, P., Kharitonov, S.A., Ciabattoni, G., Corradi, M., LensenL.v., Geddes, D.M., Hodson, M.E., and Barnes, P.J., 2000, Exhaled 8-isoprostane as a New Non-Invasive Biomarker of Oxidative Stress in Cystic Fibrosis, *Thorax*, 55
- Ogino, K. dan Wang, D.H., 2007, Biomarkers of Oxidative / Nitrosative Stress an Approach to Disease Prevetion, *Acta Med Okayama*, 61 (4)
- Oktavianis, 2011, Efek Pemberian Asap Rokok (*Rattusnovegicus*), *Tesis*, Universitas Andalas, Padang
- Saleh, 2002, Oxidative Stress and Male Infertility, from Research Bench to Clinical Practice, *JournalofAndrology*, 6 (23)
- ToornM.V.D., Rezayat, D., Kauffman., H.F., Stephan J.L.B., Rijk, GansO.B., Gerard H., Augustine M. K., Choi, Antoon J. M., van Oosterhout, and SlebosD.J., 2009, Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Lipid-Soluble Components in Cigarette Smoke Induce lung Epithelial Eell, *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol*, 297 : L109-L114
- Wijaya, H., 2010, Gen CYP2A6 Meningkatkan Ketergantungan Fisik Peroko Terhadap Nikotin, *Tesis*, Universitas Udayana, Bali
- Wu, Defeng., dan Cederbaum, Arthur I., 2003, Alcohol, Oxidative Stress, andFree Radical Damage, *Alcohol Research & Health*, 27 (4)