

INTISARI

Latar Belakang: Hipoksia merupakan suatu kondisi ketika pasokan oksigen seluler berkurang sehingga kebutuhan tidak terpenuhi. Kondisi hipoksia yang berulang-ulang memicu stres oksidatif berlebihan dan inflamasi, serta diikuti dengan aktivasi respon homeostatik oleh antioksidan secara enzimatis maupun non-enzimatis. *Ficus carica* yang kaya antioksidan diduga mampu menekan stres oksidatif dan inflamasi akibat induksi hipoksia intermiten kronis (HIK). Penelitian ini secara khusus menguji fenomena yang terjadi pada jaringan paru.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek positif pemberian *puree Ficus carica* (PFC) terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA), *Superoxide Dismutase* (SOD), rasio SOD/MDA, *Platelet Lymphocyte Ratio* (PLR) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) pada jaringan paru akibat induksi HIK.

Metode: Penelitian ini adalah jenis eksperimental dengan rancangan pre-posttest control dan post control menggunakan 30 ekor tikus Sprague Dawley yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu: kontrol netral (K), positif (HRE), negatif (HR), serta 3 kelompok intervensi PFC dengan dosis yang berbeda masing-masing 1,25, 2,5, 5,0 mL/200grBB/hari (HRF-1,25, HRF-2,50, dan HRF-5,0). Subjek diinduksi HIK dengan siklus hipoksia 4 jam/hari dan reoksigenasi 20 jam selama 30 hari. Kadar MDA, SOD dan TNF- α homogenat paru diukur menggunakan ELISA, kadar PLR darah diukur menggunakan *Hematology analyzer*.

Hasil: Perbedaan yang signifikan ditemukan pada kadar MDA homogenat paru yang lebih rendah pada HRF-5,0 ($0,39 \pm 0,19$ ng/mL), kadar SOD homogenat paru lebih tinggi pada HRF-5,0 ($3,02 \pm 1,04$ ng/mL), SOD/MDA lebih tinggi pada HRF-5,0 ($7,91 \pm 1,11$ ng/mL), dan kadar TNF- α homogenat paru lebih rendah pada kelompok HRF-5,0 ($25,37 \pm 0,561$ ng/mL) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Kadar PLR darah menunjukkan adanya perbedaan rerata yang lebih rendah pada kelompok HRF-5,0 ($50,01 \pm 17,31$ ng/mL) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Kesimpulan: Penelitian ini menunjukkan potensi PFC dalam menekan stres oksidatif dan inflamasi pada paru tikus yang diinduksi HIK.

Kata kunci: *Puree Ficus carica*, hipoksia intermiten kronis, paru, stres oksidatif, inflamasi, MDA, SOD, PLR, TNF- α .

ABSTRACT

Background: Hypoxia is a condition of reduced thus lack of cellular oxygen supply. Repeated hypoxic conditions trigger excessive oxidative stress and inflammation, followed by activation of the homeostatic response through enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Ficus carica* is a fruit rich in antioxidants, thus may be predicted effectively suppress the oxidative stress and inflammation caused by induced chronic intermittent hypoxia (CIH). This study investigates the similar phenomena in the lung tissue.

Aim: To investigate the potential benefits of administering puree *Ficus carica* (PFC) amongst Sprague Dawley (SD) rats with CIH induction and its effect on the levels of Malondialdehyde (MDA), Superoxide Dismutase (SOD), SOD/MDA ratio, Platelet Lymphocyte Ratio (PLR), and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).

Methods: This is an experimental design with a pre-posttest control and post-control. Thirty SD rats divided into six groups: neutral control (K), positive control given vitamin E (HRE), negative control (HR), and three PFC intervention groups with different doses 1.25, 2.5, 5.0 mL/200gBw/day respectively (HRF-1.25, HRF-2.50, and HRF-5.0). Except neutral control group, rats were on CIH with a cycle of four hours of hypoxia/day and 20 hours of reoxygenation for 30 days. ELISA method was used to measure MDA, SOD, and TNF- α levels in lung homogenate, while a hematology analyzer was used to measure blood PLR levels.

Results: The study found significant differences in lung homogenate levels between the HRF-5.0 and negative control groups. The MDA levels were lower (0.39 ± 0.19 ng/mL) and SOD levels were higher (3.02 ± 1.04 ng/mL) in the HRF-5.0 group compared to HR. The SOD/MDA ratio was higher (7.91 ± 1.11 ng/mL) and TNF- α levels were lower (25.37 ± 0.561 ng/mL) in the HRF-5.0 group compared to HR. Lower blood PLR levels (50.01 ± 17.31 ng/mL) was found in HRF-5.0 compared to HR.

Conclusion: This study demonstrated the beneficial effect of PFC to suppress the level of pulmonary oxidative stress and inflammation induced by CIH in SD rats.

Keywords: Puree *Ficus carica*, chronic intermittent hypoxia, lung, oxidative stress, inflammation, MDA, SOD, PLR, TNF- α .

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Oksigen (O₂) memainkan peran penting dalam respirasi dan metabolisme aerobik sebagai akseptor elektron terakhir dari rantai transpor elektron mitokondria yang bertanggung jawab untuk menghasilkan sebagian besar ATP dalam sel eukariotik. Oksigen pada dasarnya dibutuhkan oleh sebagian besar organisme eukariotik sebagai *scavenger* (pemulung) untuk menghilangkan elektron berbahaya dan ion hidrogen yang dihasilkan sebagai produk sampingan dari fosforilasi oksidatif mitokondria. Semua sel berinti dapat merasakan konsentrasi oksigen dan merespons berkurangnya ketersediaan oksigen (Yeo, 2019; Chen *et al.*, 2020).

Kondisi berkurangnya oksigen pada jaringan menyebabkan terjadinya hipoksia (Chen *et al.*, 2020; Dengler, 2020). Perubahan konsentrasi oksigen di sekitar atmosfer dideteksi oleh kemoreseptor sentral dan arteri. Kemoreseptor sentral terdapat di medula batang otak dekat pusat pernapasan dan kemoreseptor arteri terdapat di badan aorta serta badan karotis. Penginderaan oksigen juga dikendalikan oleh sel-sel neuroendokrin paru dalam badan neuroepitel yang mengarahkan kemosisitivitas yang penting untuk penginderaan oksigen (Yeo, 2019).

Kondisi hipoksia menimbulkan gejala yang dapat dinilai melalui adanya peningkatan ekspresi gen penanda *hypoxia inducible factor* (HIF) sebagai strategi untuk beradaptasi (Yeo, 2019; Dengler, 2020; Lee *et al.*, 2020). Strategi adaptasi tersebut berupa peningkatan pengiriman oksigen melalui peningkatan jumlah sel

darah merah atau pembuluh darah, mengubah metabolisme energi, meningkatkan motilitas sel sehingga mencegah kematian sel (Nakayama & Kataoka, 2019). Situasi hipoksia dapat dikondisikan melalui beberapa metode yaitu, hipoksia akut, hipoksia kronis baik secara berkelanjutan ataupun intermiten.

Hipoksia intermiten kronis (HIK) merupakan salah satu jenis kondisi hipoksia yang terdiri dari siklus normoksia dan hipoksia yang berulang (Song *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Hipoksia intermiten kronis mampu mengaktivasi NF- κ B yang memicu produksi mediator inflamasi, seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Yeo, 2019). Inflamasi dan hipoksia memiliki hubungan yang digambarkan sebagai “dua sisi mata uang yang sama”. Hipoksia dapat menyebabkan inflamasi, begitu juga sebaliknya, inflamasi juga mampu menimbulkan keadaan hipoksia (McNamee *et al.*, 2013; Corrado & Fontana, 2020).

Hipoksia intermiten kronis juga menyebabkan terjadinya stres oksidatif akibat peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dan penurunan antioksidan endogen (Song *et al.*, 2017). *Malondialdehyde* (MDA) mengalami peningkatan akibat hasil dari peroksidasi lipid selama stres oksidatif (Dromant *et al.*, 2021). Aktivitas enzim antioksidan, seperti superoksida dismutase (SOD), juga mengalami penurunan selama hipoksia intermiten kronis (Iturriaga and Galán, 2019). Paru sangat rentan terhadap hipoksia, keadaan stres oksidatif yang diakibatkan oleh hipoksia mampu menyebabkan serangkaian respons inflamasi dan pelepasan sitokin inflamasi yang mengakibatkan cedera paru (Song *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Antioksidan endogen yang mengalami penurunan perlu mendapatkan bantuan dari antioksidan eksogen untuk dapat mengatasi stres oksidatif sehingga

mampu mengurangi respon inflamasi akibat hipoksia intermiten kronis (Neha *et al.*, 2019). Untuk menunjukkan tingkat kerusakan sel yang diakibatkan oleh ROS dan kapasitas antioksidannya maka digunakan rasio SOD/MDA (Zhang *et al.*, 2022). Pangan fungsional merupakan makanan yang mengandung nutrisi atau senyawa bioaktif tertentu yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan (Silveira and Mellado, 2014; Tripathi *et al.*, 2018). Salah satu contoh pangan fungsional adalah *Ficus carica* (Ayuso *et al.*, 2022). *Ficus carica* mengandung senyawa fenolik, asam organik, dan senyawa volatil yang menjadikannya berpotensi diunggulkan menjadi salah satu bahan pangan fungsional, yang bertindak sebagai antioksidan sehingga menurunkan stres oksidatif (Mousa *et al.*, 2021) dan memiliki efek antiinflamasi sehingga dapat berkontribusi dalam penurunan respon inflamasi (Hajam & Saleem, 2022).

I.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana kadar MDA homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis setelah pemberian *puree Ficus carica* dibandingkan dengan kelompok tanpa intervensi?
2. Bagaimana kadar SOD homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis setelah pemberian *puree Ficus carica* dibandingkan dengan kelompok tanpa intervensi?
3. Bagaimanakah kadar Rasio SOD/MDA pada homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis setelah pemberian *puree Ficus carica* dibandingkan dengan kelompok tanpa intervensi?

4. Bagaimanakah kadar *Platelet Lymphocyte Ratio* (PLR) tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis setelah diberikan *puree Ficus carica* dibandingkan dengan kelompok tanpa intervensi?
5. Bagaimanakah kadar TNF- α pada homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis setelah diberikan *puree Ficus carica* dibandingkan dengan kelompok tanpa intervensi?

I.3. Tujuan Penelitian

I.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi senyawa antioksidan pada *puree Ficus carica* sebagai *scavenger* terhadap stres oksidatif pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis pada organ paru.

I.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh dari pemberian *puree Ficus carica* yang berfungsi sebagai senyawa antioksidan terhadap stres oksidatif melalui perbandingan kadar MDA homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi oleh hipoksia intermiten kronis antara kelompok intervensi dengan kelompok tanpa intervensi.
2. Menganalisis pengaruh pemberian *puree Ficus carica* sebagai *scavenger* stres oksidatif melalui perbandingan kadar SOD pada homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi oleh hipoksia intermiten kronis antara kelompok intervensi dan kelompok tanpa intervensi.
3. Menganalisis pengaruh *puree Ficus carica* terhadap stres oksidatif melalui perbandingan rasio SOD/MDA pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi

hipoksia intermiten kronis antara kelompok tanpa intervensi dan kelompok intervensi.

4. Menganalisis pengaruh *puree Ficus carica* terhadap respon inflamasi pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis melalui perbandingan kadar *Platelet Lymphocyte Ratio* (PLR) pada darah *pre-post test* antara kelompok intervensi dengan kelompok tanpa intervensi.
5. Menganalisis pengaruh *puree Ficus carica* terhadap inflamasi melalui perbandingan kadar TNF- α pada homogenat jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis antara kelompok intervensi dengan kelompok tanpa intervensi.

I.4. Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai hipoksia intermiten kronis telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya, berikut ini merupakan beberapa penelitian yang memiliki ruang lingkup yang sama dengan penelitian ini:

Judul	Tujuan	Hasil	Persamaan	Perbedaan
<i>Angiotensin-(1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats</i> (Lu et al., 2016)	Menyelidiki peradangan dan stres oksidatif pada jaringan paru menggunakan model hipoksia tikus untuk mengeksplorasi efek Angiotensin (1-7) pada cedera paru yang disebabkan oleh hipoksia intermiten kronis (HIK) serta	Hasil analisis menunjukkan bahwa Angiotensin (1-7) memiliki peran protektif terhadap peradangan dan stres oksidatif pada cedera paru yang disebabkan oleh hipoksia intermiten kronis, yang sebagian dimediasi oleh penghambatan pelepasan sitokin proinflamasi dan stres oksidatif.	Efek hipoksia di paru dengan menganalisis kadar sitokin proinflamasi yaitu TNF- α	Durasi pemberian hipoksia pada penelitian ini yaitu 4 jam/hari selama 30 hari dengan pemberian intervensi <i>puree Ficus carica</i> .

	menguji hipotesis bahwa Angiotensin (1-7) mengurangi cedera paru yang disebabkan oleh HIK dan memberikan efek perlindungan melalui penghambatan peradangan dan stres oksidatif.			
<i>Sinomenine Attenuates Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Lung Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress (Zhang et al., 2018).</i>	Menyelidiki efek pemberian sinomenine pada cedera paru yang disebabkan oleh hipoksia intermiten kronis pada tikus.	Hasil analisis menunjukkan bahwa sinonime dapat membalikkan cedera paru yang disebabkan oleh hipoksia intermiten kronis melalui penghambatan peradangan dan stres oksidatif.	Penanda stres oksidatif pada jaringan paru yaitu MDA dan SOD.	Durasi pemberian hipoksia pada penelitian ini selama 4 jam/hari selama 30 hari dengan pemberian intervensi <i>puree Ficus carica</i> .
<i>Intermittent Hypoxia Contributes to the Lung Damage by Increased Oxidative Stress, Inflammation, and Disbalance in Protease/Antiprotease System (Tuleta et al., 2016).</i>	Menguji pengaruh hipoksia intermiten pada stres oksidatif, inflamasi, dan sistem protease/antiprotease pada paru tikus.	Hipoksia intermiten memiliki kontribusi terhadap kerusakan paru melalui peningkatan stres oksidatif, peradangan, dan ketidakseimbangan dalam sistem protease/antiprotease .	Efek hipoksia dilihat dari peningkatan stres oksidatif dan peradangan pada paru.	Durasi pemberian hipoksia intermiten kronis pada penelitian ini adalah 4 jam/hari selama 30 hari dengan pemberian intervensi <i>puree Ficus carica</i> . Terdapat perbedaan pada parameter stres oksidatif dan peradangan.

<i>Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) Pathway Promotes Pulmonary Inflammation in Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Obstructive Sleep Apnea (Yang et al., 2018).</i>	Menilai fungsi TLR-4 pada peradangan paru yang diinduksi hipoksia intermiten kronis yang mensimulasikan <i>Obstructif Sleep Apnea</i> (OSA).	Hipoksia intermiten kronis menyebabkan respon inflamasi, jalur inflamasi yang terlibat dalam reseptor TLR-4 mungkin menjadi salah satu mekanisme yang memicu inflamasi paru.	Inflamasi pada paru yang disebabkan oleh hipoksia intermiten kronis dianalisis menggunakan parameter TNF-alfa, stres oksidatif pada paru dianalisis menggunakan parameter MDA dan SOD.	Durasi pemberian hipoksia intermiten kronis pada penelitian ini yaitu 4 jam/hari selama 30 hari dengan pemberian intervensi <i>puree Ficus carica</i> .
<i>Antioxidative Parameters Improvements on Nutritional Approach: A Study on Hypoxic Multiple Organs of Sprague-Dawley (Meliala et al., 2024)</i>	Mengevaluasi pengaruh <i>pure Ficus carica</i> (PFC) pada parameter hematologi dan stress oksidatif yang disebabkan oleh kondisi hipoksia intermiten di jantung, ginjal, dan usus besar dari perspektif biokimia.	Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan dalam PFC melawan stress oksidatif yang disebabkan oleh hipoksia intermiten dan menunjukkan bahwa konsumsi PFC yang mengandung senyawa bioaktif (flavonoid, triptofan, dan serat makanan) mungkin bermanfaat untuk strategi pencegahan kondisi hipoksia.	Meneliti potensi PFC sebagai antioksidan eksogen terhadap stres oksidatif yang diinduksi hipoksia intermiten dengan durasi 4 jam/hari serta dianalisis menggunakan parameter MDA, SOD dan hematologi.	Durasi pemberian hipoksia pada penelitian ini selama 30 serta pada penelitian ini menganalisis stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan paru.

I.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini penulis harapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai potensi *Ficus carica* sebagai pangan fungsional dengan kandungan antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap universitas, khususnya bagi prodi Magister Ilmu Biomedik serta dapat memberikan referensi bagi mahasiswa maupun peneliti lain.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Pustaka

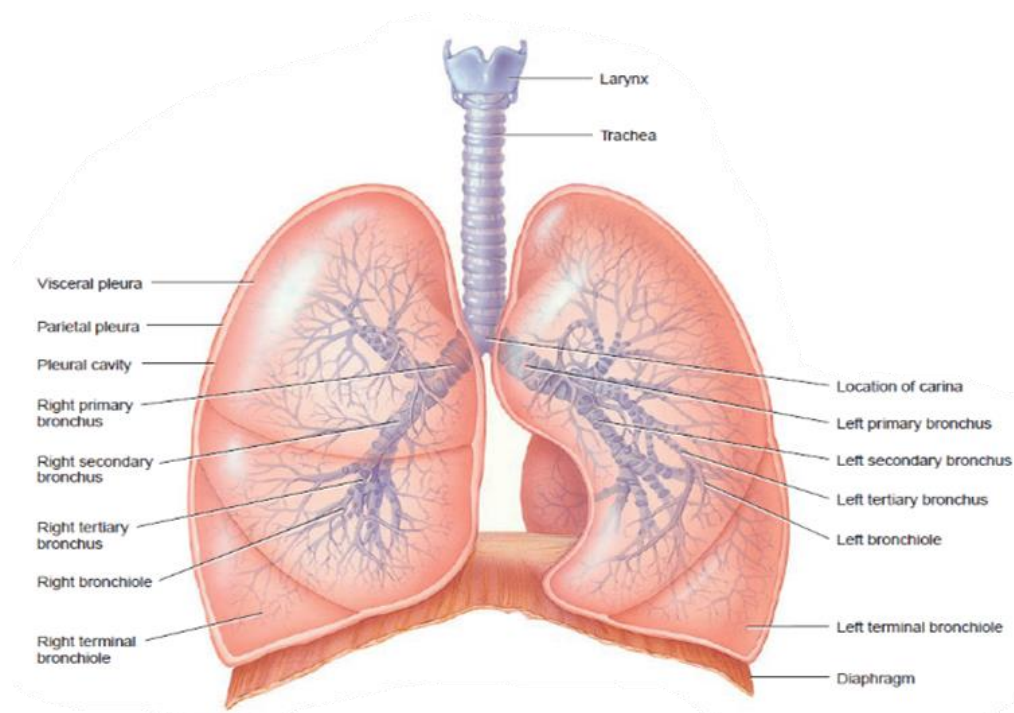
II.1.1. Anatomi Paru

Paru merupakan organ pernapasan berpasangan berbentuk kerucut yang terletak di rongga dada dan menempati sebagian besar volume rongga dada (toraks). Struktur lain yang terletak di dada selain paru adalah jantung beserta pembuluh-pembuluh terkait, esofagus, timus dan beberapa saraf. Rongga dada (toraks) luar dibentuk oleh 12 pasang iga melengkung, yang berhubungan dengan sternum (tulang dada) di anterior dan vertebra torakalis (tulang punggung) di posterior. Sangkar iga merupakan tulang protektif bagi paru dan jantung (Sherwood, 2016).

Paru kanan dan kiri dipisahkan satu sama lain oleh mediastinum, tempat jantung, pembuluh darah besar, bronkus, kerongkongan, dan organ lainnya berada. Mediastinum membagi rongga toraks menjadi dua ruang yang berbeda secara anatomis. Setiap paru terdiri dari saluran pernapasan dan alveoli. Paru yang sehat lembut dan ringan. Stroma paru terdiri dari jaringan ikat elastis berserat, yang memungkinkan paru mundur secara pasif selama ekspirasi. Paru kanan relatif lebih besar daripada paru kiri karena jantung lebih banyak bergumpal ke kiri daripada ke kanan (Tortora *et al.*, 2009; Aung *et al.*, 2019).

Permukaan mediastinum (medial) dari setiap paru berisi daerah, hilus, di mana bronkus, pembuluh darah paru, pembuluh limfatik, dan saraf masuk dan keluar. Struktur ini disatukan oleh pleura dan jaringan ikat dan merupakan akar dari paru. Secara medial, paru kiri juga mengandung cekungan, takik jantung, tempat

jantung berada. Karena ruang yang ditempati jantung, paru kiri berukuran sekitar 10% lebih kecil dari paru kanan. Meskipun paru kanan lebih tebal dan lebar, namun juga lebih pendek dari paru kiri karena diafragma lebih tinggi di sisi kanan, menampung hati yang terletak di bawahnya. Anatomi paru dapat dilihat pada Gambar 1 (Tortora *et al.*, 2009).



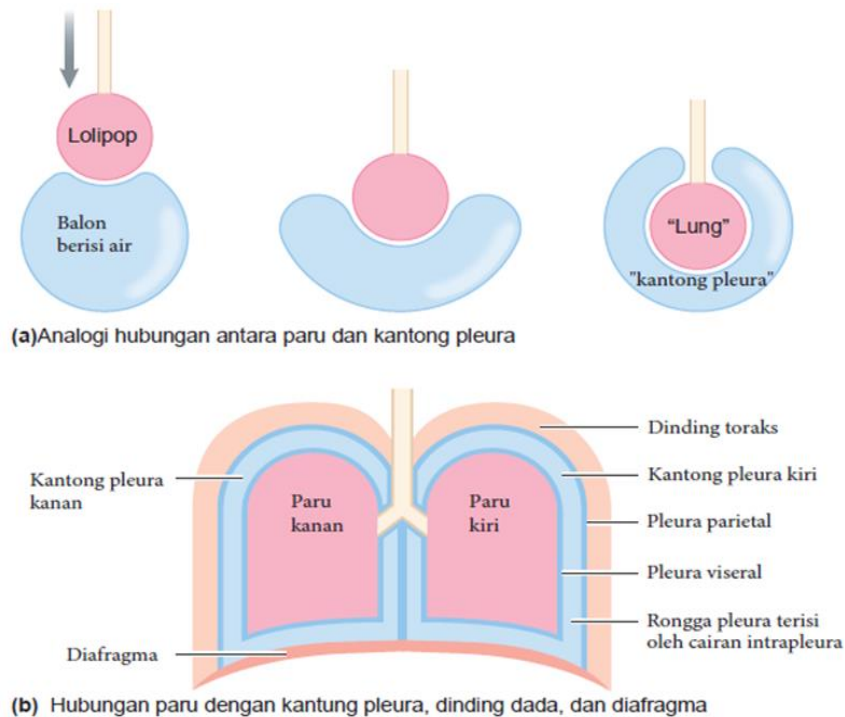
Gambar 1. Anatomi paru (dikutip dari: Tortora *et al.*, 2009)

Kedua paru masing-masing dibagi menjadi beberapa lobus dan masing-masing mendapat satu bronkus. Jaringan paru itu sendiri terdiri dari serangkaian saluran napas yang sangat bercabang-cabang, alveolus, pembuluh darah paru, dan sejumlah besar jaringan ikat elastik. Satu-satunya otot di dalam paru adalah otot polos di dinding arteriol dan dinding bronkiolus, keduanya berada dibawah kontrol. Tidak terdapat otot di dalam dinding alveolus untuk mengembangkan atau mengempiskan alveolus selama proses bernapas. Perubahan volume paru (dan

perubahan volume alveolus yang menyertainya) ditimbulkan oleh perubahan dalam dimensi rongga toraks (Sherwood, 2016).

Paru merupakan struktur elastis yang akan mengempis seperti balon dan mengeluarkan semua udaranya melalui trakea bila tidak ada kekuatan untuk mempertahankan perkembangannya. Tidak terdapat pelekatan antara paru dan dinding rangka dada kecuali di bagian hilum paru tempatnya ditopang pada mediastinum, bagian tengah rongga dada. Bahkan, paru sebetulnya "mengapung" dalam rongga toraks, dikelilingi oleh suatu lapisan tipis berupa membran serosa berlapis ganda yang disebut dengan membran pleura (Guyton *et al.*, 2020; Sherwood, 2016; Tortora *et al.*, 2009).

Membran pleura merupakan lapisan superfisial yang terdiri dari pleura parietal yang melapisi dinding toraks dan lapisan dalam yang disebut pleura visceral yang menutupi paru itu sendiri. Di antara pleura parietal dan pleura visceral terdapat ruang kecil yang disebut rongga pleura, di dalam rongga ini terdapat sejumlah kecil cairan pelumas yang disekresikan oleh membran yang menjadi pelumas bagi pergerakan paru di dalam rongga dan menjadi pelindung paru dari gesekan satu sama lain saat terjadi pernapasan. Rongga pleura terpisah mengelilingi paru kiri dan kanan. Lapisan-lapisan kantong pleura ini berkontak erat satu sama lain, analogi hubungan paru dan cairan pleura dapat dilihat pada Gambar 2 (Guyton *et al.*, 2020; Sherwood, 2016; Tortora *et al.*, 2009).

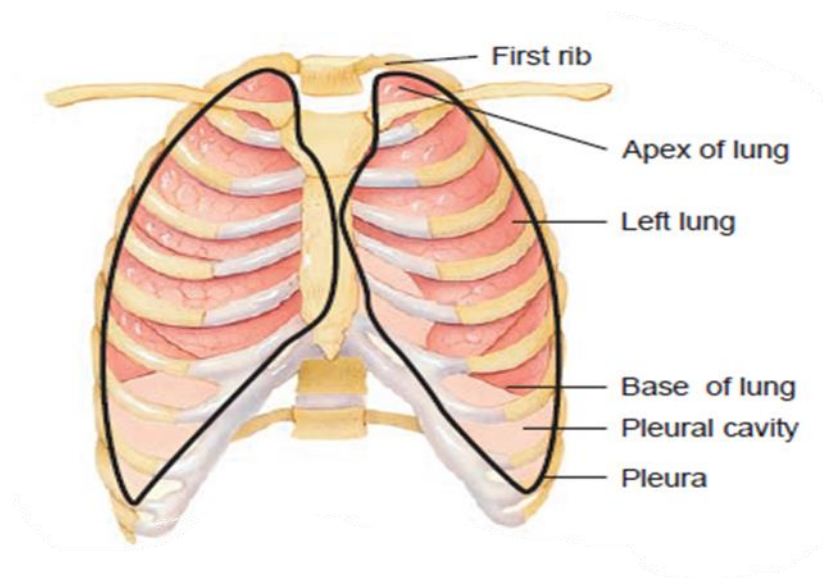


Gambar 2. Analogi hubungan paru dan kantong pleura (dikutip dari: Sherwood, 2016)

Paru memanjang dari diafragma hingga sedikit lebih tinggi dari klavikula dan terletak di depan dan belakang tulang rusuk. Bagian inferior yang luas dari paru, bagian dasarnya, cekung dan pas di atas area cembung diafragma. Bagian superior yang sempit dari paru adalah apex. Permukaan paru yang terletak di dekat tulang rusuk, permukaan kosta, cocok dengan kelengkungan tulang rusuk yang membulat (Tortora *et al.*, 2009).

Diafragma, yang membentuk lantai rongga toraks, adalah suatu lembaran otot rangka yang lebar, berbentuk kubah, dan memisahkan rongga toraks dari rongga abdomen. Diafragma ditembus hanya oleh esofagus dan pembuluh darah yang melintasi rongga toraks dan abdomen. Di leher, otot dan jaringan menutup rongga toraks. Satu-satunya komunikasi antara toraks dan atmosfer adalah melalui

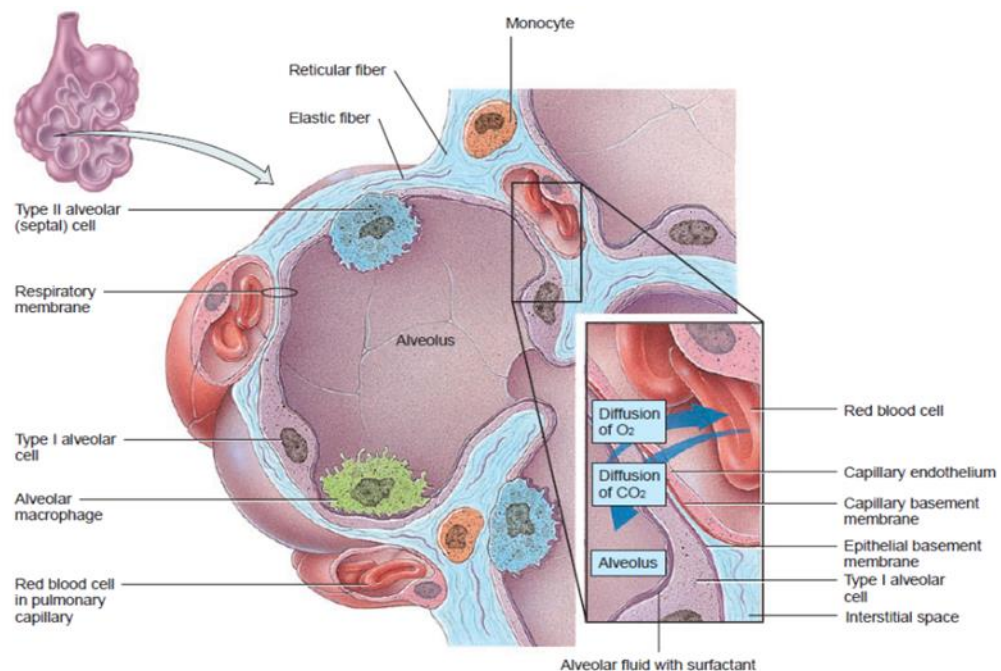
saluran napas ke dalam alveolus. Seperti paru, dinding dada mengandung banyak jaringan ikat elastik. Pada gambar 3 terlihat gambaran anterior paru dan pleura di toraks (Sherwood, 2016).



Gambar 3. Gambaran anterior paru dan pleura di toraks (dikutip dari: Tortora et al., 2009)

Paru memiliki struktur yang ideal untuk pertukaran gas. Pertukaran gas di paru didukung oleh alveolus. Alveolus merupakan kelompok-kelompok kantong mirip anggur yang berdinding tipis dan dapat mengembang di ujung cabang saluran napas penghantar. Alveolus dilapisi oleh dua jenis sel epitel, yaitu sel alveolus tipe I dan sel alveolus tipe II. Sel alveolus tipe I berupa sel gepeng dengan tonjolan sitoplasma besar dan merupakan sel-sel utama yang melapisi alveolus, menutupi sekitar 95% luas permukaan epitel alveolus. Sel tipe II (pneumosit granular) lebih tebal dan mengandung banyak badan inklusi lamelar. Meskipun sel-sel ini hanya membentuk 5% luas permukaan, namun mereka mewakili sekitar 60% sel epitel. Sel alveolus tipe II ini berperan penting dalam perbaikan alveolus dan fisiologi sel

lainnya, salah satu fungsi utama sel tipe II adalah membentuk surfaktan paru yang merupakan suatu kompleks fosfolipoprotein yang mempermudah ekspansi paru. Selain itu, terdapat makrofag alveolus yang berjaga-jaga di dalam lumen kantong udara ini. Di dinding antara alveolus yang berdekatan terdapat pori Kohn yang halus. Keberadaan pori ini memungkinkan aliran udara antara alveolus-alveolus yang berdekatan, suatu proses yang dikenal sebagai ventilasi kolateral. Saluran-saluran ini sangat penting agar udara segar dapat masuk ke alveolus yang saluran penghantar terminalnya tersumbat akibat penyakit. Struktur dari alveolus dapat dilihat pada gambar 4 (Guillot *et al.*, 2013; Ganong, 2012; Sherwood, 2016).



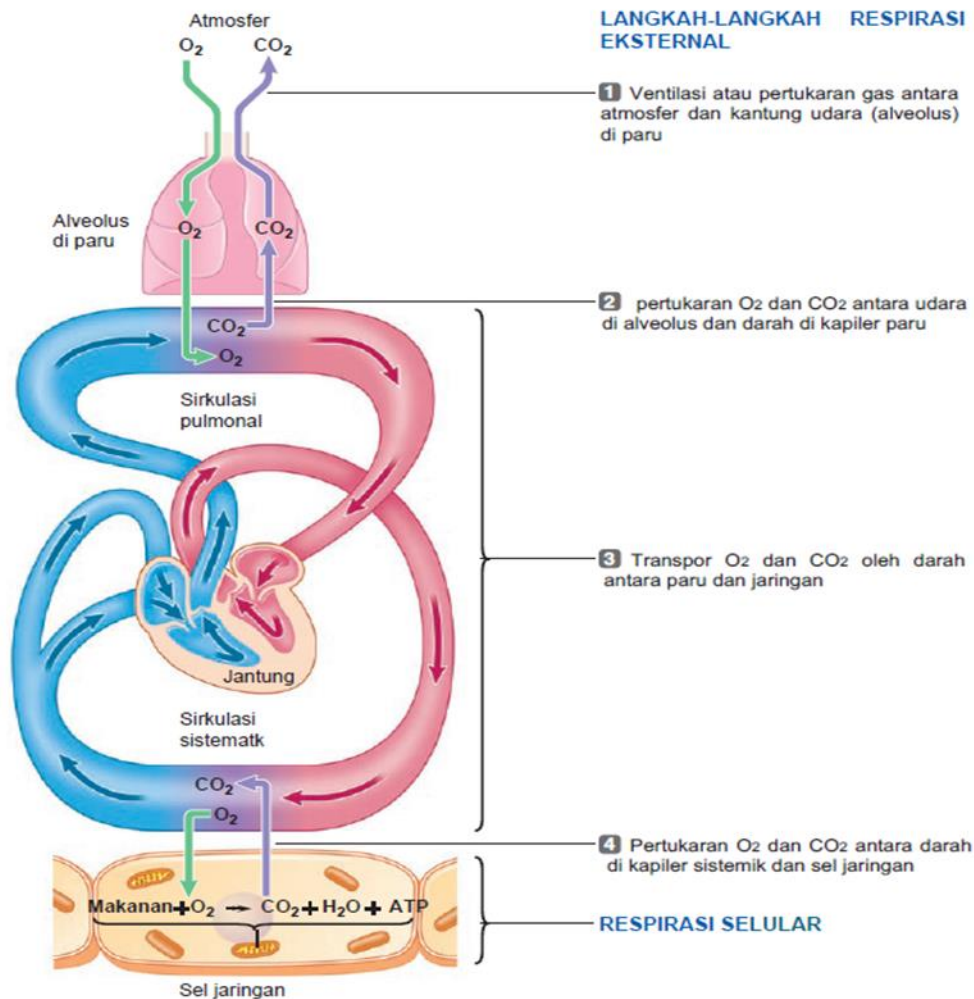
Gambar 4. Struktur komponen alveolus (dikutip dari: Tortora *et al.*, 2009)

II.1.2. Fisiologi Pernapasan

Sel-sel tubuh secara terus-menerus menggunakan oksigen (O₂) untuk reaksi metabolisme yang melepaskan energi dari molekul nutrisi dan menghasilkan ATP. Respirasi (pernapasan) merupakan proses pengambilan O₂ dan pengeluaran CO₂

dari tubuh yang merupakan fungsi utama paru. Saat beristirahat, manusia normal bernapas 12-15 kali per menit. Setiap napas mengandung 500 mL udara yang berarti ada 6-8 L udara yang dihirup dan dihembuskan setiap menit. Saat udara telah mencapai paru sedalam alveolus, akan terjadi difusi sederhana yang memungkinkan O₂ masuk ke dalam darah di kapiler paru dan CO₂ masuk ke alveolus untuk kemudian dihembuskan keluar. Selain berfungsi dalam pertukaran gas, sistem pernapasan juga berpartisipasi dalam mengatur pH darah, mengandung reseptor untuk indra penciuman, menyaring udara yang dihirup, menghasilkan suara, dan mengeluarkan air dan panas dari tubuh dalam udara yang dihembuskan (Tortora *et al.*, 2009; Araneda & Tuesta, 2012).

Sistem pernapasan dimulai dari hidung, diikuti oleh faring, laring, dan trakea bronkus, dan paru (Verma *et al.*, 2015). Bagian-bagian dari sistem pernapasan dapat diklasifikasikan menurut struktur (struktural) ataupun fungsinya (fungsional). Secara struktural, sistem pernapasan terdiri dari dua bagian, yaitu: (1) Sistem pernapasan bagian atas meliputi hidung, faring, dan struktur terkait. (2) Sistem pernapasan bagian bawah meliputi laring, trakea, bronkus, dan paru. Secara fungsional, sistem pernapasan juga terdiri dari dua bagian yaitu: (1) Zona konduksi, terdiri dari serangkaian rongga dan saluran yang saling berhubungan baik di luar maupun di dalam paru. (2) Zona pernapasan terdiri dari jaringan di dalam paru tempat pertukaran gas terjadi (Tortora *et al.*, 2009).

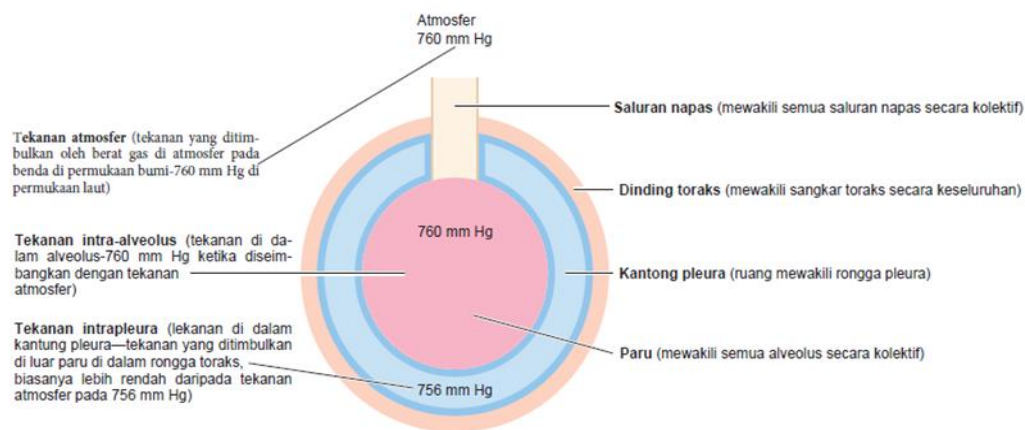


Gambar 5. Respirasi selular dan eksternal (dikutip dari: Sherwood, 2016)

Respirasi atau yang sering disebut dengan bernafas dibagi menjadi 2, yaitu respirasi selular dan respirasi eksternal (Gambar 5). Respirasi selular merujuk pada proses-proses metabolik intrasel yang terjadi didalam mitokondria, proses ini menggunakan O_2 dan menghasilkan CO_2 untuk menghasilkan energi. Sedangkan respirasi eksternal merupakan seluruh rangkaian kejadian pertukaran antara oksigen dan karbondioksida antara lingkungan eksternal dan sel tubuh (Sherwood, 2016).

Paru dapat dikembang-kempiskan melalui dua cara: (1) dengan gerakan naik turunnya diafragma untuk memperbesar atau memperkecil rongga dada,

pernapasan normal dan tenang dapat dicapai menggunakan cara ini dan (2) dengan mengangkat dan menekan tulang iga untuk memperbesar atau memperkecil diameter anteroposterior rongga dada, pengembangan paru melalui cara ini dapat terjadi pada kondisi istirahat (Guyton *et al.*, 2020).



Gambar 6. Tekanan penting yang ada di paru (dikutip dari: Sherwood, 2016)

Pernapasan normal dapat dicapai melalui gerakan diafragma. Udara mengalir masuk dan keluar paru selama tindakan bernapas karena berpindah mengikuti gradien tekanan antara alveolus dan atmosfer yang berbalik arah secara bergantian yang ditimbulkan oleh aktivitas siklik otot pernapasan. Terdapat tiga tekanan yang berbeda yang berperan penting dalam ventilasi (Gambar 6). Pada saat sebelum melakukan inspirasi tekanan udara yang ada di paru sama dengan tekanan udara yang ada di atmosfer, yaitu sekitar 760 milimeter air raksa (mmHg) atau 1 atmosfer (atm). Agar udara dapat mengalir ke paru maka tekanan yang ada di alveolus harus lebih rendah daripada tekanan atmosfer, kondisi ini dapat dicapai dengan cara meningkatkan ukuran paru (Ganong, 2012; Sherwood, 2016; Tortora *et al.*, 2009).

II.1.3. Hipoksia

Hipoksia didefinisikan sebagai suatu kondisi dimana pasokan oksigen seluler berkurang sehingga tidak memenuhi kebutuhan oksigen seluler, kurangnya suplai oksigen maupun konsumsi oksigen berlebihan yang mengakibatkan tidak tercukupinya kadar oksigen untuk mempertahankan fungsi sel normal (Chen *et al.*, 2020; Dengler, 2020). Untuk menghambat energi, sel akan merespon dengan cara menghambat proses konsumsi energi, salah satu proses yang banyak membutuhkan energi adalah translasi protein, sehingga pada saat hipoksia sintesis protein akan dihambat secara signifikan (Nakayama & Kataoka, 2019).

Perubahan konsentrasi oksigen yang terjadi di sekitar atmosfer dideteksi oleh kemoreseptor sentral dan arteri. Kemoreseptor sentral terdapat di medula batang otak dekat pusat pernapasan, sedangkan kemoreseptor arteri terdapat di badan aorta dan badan karotis. Aktivasi kemoreseptor arteri merangsang jalur pelepasan neurotransmitter dan memodulasi aktivitas endopeptidase netral yaitu neprilysin (NEP), yang mengubah respons seluler terhadap hipoksia dengan menghidrolisis substansi (Yeo, 2019).

Respon hipoksia adalah proses sistemik yang mengatur berbagai aktivitas seluler untuk mempertahankan homeostasis dalam kondisi hipoksia. Respon ini meningkatkan pengiriman oksigen dengan meningkatkan jumlah sel darah merah atau pelebaran pembuluh darah, mengubah metabolisme energi, meningkatkan motilitas sel, dan dengan demikian memungkinkan adaptasi sel dan mencegah kematian sel. Respons hipoksia melindungi terhadap stres, tetapi mendorong

perkembangan penyakit dalam beberapa kondisi patologis (Nakayama & Kataoka, 2019).

Hipoksia mengaktivasi gen *hypoxia inducible factor* (HIF) yang merupakan faktor transkripsi yang terdiri dari subunit α dan β , yang bersama-sama mengatur transkripsi gen yang memediasi respons homeostatis terhadap penurunan oksigenasi. Sub-unit α dari HIF1 dan HIF2 (masing-masing HIF1 α dan HIF2 α) bergantung pada hipoksia, namun sub-unit HIF β secara konstitutif diekspresikan pada semua tipe sel berinti (Gupta *et al.*, 2019).

Dalam kondisi normoksia, hidroksilasi subunit HIF- α bergantung pada oksigen terjadi pada residu prolin yang berbeda, didorong oleh enzim domain *prolyl hydroxylases* (PHD). Hidroksilasi HIF- α memfasilitasi pengikatan dengan protein *Von Hippel-Lindau* (VHL) yang berinteraksi dengan elongin C dan merekrut kompleks ligase ubiquitin yang menyebabkan ubiquitinasi dan degradasi proteosomal yang cepat. Residu asparagin dari subunit HIF- α juga dihidroksilasi oleh *factors inhibiting HIF* (FIHs), yang menghambat pengikatan HIF dengan koaktivator protein pengikat p300/CREB. Di bawah hipoksia, aktivitas PHD dan FIH ditekan yang memungkinkan subunit HIF- α terakumulasi di nukleus dimerisasi dengan HIF β dan berikatan dengan elemen responsif hipoksia (HRE) di wilayah promotor atau penambah gen targetnya dan mengaktifkan transkripsi mereka. Ada jalur pensinyalan independen HIF lainnya yang diaktifkan di bawah hipoksia, seperti jalur *nuclear faktor- κ B* (NF- κ B). Semua studi ini mendukung anggapan bahwa hipoksia dan inflamasi memiliki hubungan yang saling bergantung (Lee *et al.*, 2019; Dengler, 2020).

HIF-1 α yang teraktivasi menyebabkan peningkatan transkripsi sejumlah gen, seperti VEGF, EPO, dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Faktor-faktor ini berpartisipasi dalam respons adaptif terhadap hipoksia dengan meningkatkan perfusi jaringan dan oksigenasi, dan karenanya membantu pemulihan dari serangan hipoksia awal (Yeo, 2019). Pada kondisi hipoksia intermiten, defisit oksigen bebas tidak memungkinkan untuk stabilisasi HIF-1 α sehingga terjadi peningkatan HIF-1 α . Hipoksia intermiten yang mengaktivasi NF κ B mungkin terjadi melalui stres mitokondria yang akhirnya memicu produksi mediator inflamasi seperti TNF- α (Yeo, 2019).

Hipoksia dan inflamasi digambarkan sebagai “dua sisi mata uang yang sama”. Sudah diterima secara luas bahwa hipoksia dapat menyebabkan inflamasi. Hipoksia terkait inflamasi dapat dihasilkan dari kombinasi faktor yang mengakibatkan pergeseran dalam suplai dan permintaan metabolik. Pertama, di dalam jaringan yang meradang, terdapat akumulasi leukosit yang aktif secara metabolik. Pensinyalan hipoksia dan aktivasi HIF dapat memiliki efek anti dan proinflamasi untuk mengatur aktivitas sel sistem kekebalan. Ketika sel imun mengalami stimulasi inflamasi, mengubah aktivitas metaboliknya untuk memperoleh fenotipe yang biasanya dikaitkan dengan relung imunologis patologis, neutrofil yang diaktifkan meningkatkan penggunaan oksigen, sedangkan makrofag dan limfosit meningkatkan glikolisis. Akibatnya, ada penurunan jumlah oksigen lokal dan pergeseran ke lingkungan mikro hipoksia, yang mengarah ke aktivasi pensinyalan HIF dan modulasi aktivitas sel imun (McNamee *et al.*, 2013; Corrado & Fontana, 2020).

Hipoksia intermiten kronis terdiri dari siklus normoksia dan hipoksia yang berulang disebabkan oleh obstruksi pernapasan berulang karena kolaps jalan napas bagian atas, mengakibatkan desaturasi oksigen siklik. Hipoksia intermiten kronis adalah salah satu perubahan patologis yang paling khas pada OSAS. Hipoksia intermiten kronis (HIK) meningkatkan HIF-1 dengan peningkatan subunit HIF-1 α yang mengaktifkan enzim pro-oksidan dan penurunan HIF-2 α yang menyebabkan penurunan enzim antioksidan (Sforza & Roche, 2016). Beberapa penelitian telah menemukan bahwa dalam proses patologis hipoksia/reoksigenasi banyak dihasilkan kluster *reactive oxygen spesies* (ROS), yang mengarah pada terjadinya stres oksidatif dalam tubuh. Stres oksidatif yang teraktivasi oleh hipoksia intermiten kronis menyebabkan serangkaian respons inflamasi dan pelepasan sitokin inflamasi, yang mengakibatkan cedera paru dan peradangan paru (Song *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

Ada banyak data yang mendukung bahwa hipoksia intermiten kronis menyebabkan simpatoeksitasi yang berkelanjutan sepanjang hari dan perubahan pada pembuluh darah yang menyebabkan hipertensi pada OSA. Studi *in vitro* hipoksia intermiten telah menunjukkan peningkatan peradangan sistemik sekunder akibat peningkatan spesies oksigen reaktif melalui disfungsi mitokondria, aktivasi faktor transkripsi yang diinduksi hipoksia, dan pengurangan antioksidan. Efek ini tampaknya menunjukkan pelemahan dengan pemberian antioksidan. Penelitian pada hewan juga menunjukkan konsekuensi negatif dari hipoksia intermiten (May & Mehra, 2014).

Hipoksia intermiten kronis (HIK) meningkatkan ekspresi radikal bebas oksigen (ROS), yang merupakan kunci dalam respon proinflamasi sekunder terhadap ekspresi ROS, beberapa sitokin inflamasi meningkatkan konsentrasinya, menghasilkan keadaan inflamasi sistemik, meningkatkan molekul adhesi sel pembuluh darah seperti VCAM-1, dan mengaktifkan sistem saraf simpatis. Konsekuensi utamanya adalah disfungsi endotel, disregulasi metabolik, dan keadaan hiperkoagulabilitas (Labarca *et al.*, 2020).

II.1.4. Hipoksia Pada Paru

Untuk mulai mendefinisikan hipoksia, bisa dimulai dengan mendefinisikan hipoksia jaringan. Jaringan sistemik mengalami berbagai kadar normal yang berbeda dalam hal oksigenasi, seperti pada miokardium yang memiliki tekanan oksigen 20 sampai 25 mmHg yang umumnya ditemukan saat istirahat, dan selama latihan maksimal kadarnya dapat menurun hingga kurang dari 10 mmHg, sel-sel di korteks ginjal biasanya berfungsi pada tekanan oksigen di atas 60 mmHg, sedangkan di medula ginjal mungkin jauh lebih rendah. Sebaliknya, sel-sel pada paru orang dewasa jarang mengalami kadar O₂ kurang dari 40 mmHg, sedangkan sel epitel alveolar biasanya berada pada 100 mmHg. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa definisi hipoksia di paru berbeda dengan jaringan lainnya. Sel memiliki kemampuan untuk menyesuaikan definisi "normal" ketika terkena perubahan kronis dalam tingkat oksigenasinya, mungkin dengan mengubah gen ekspresi yang mengatur sensitivitas jalur pensinyalan terhadap gangguan (Schumacker, 2011).

Hipoksia memicu beberapa mekanisme pensinyalan tambahan, banyak di antaranya berinteraksi dengan pensinyalan yang bergantung pada HIF. Di bawah hipoksia, pengurangan produksi energi memiliki dampak negatif yang besar pada laju translasi protein, karena hipoksia dan HIF-1 α menghambat pensinyalan mTOR, jalur pensinyalan kritis yang terlibat dalam induksi pertumbuhan sel dan sintesis protein (Tuder *et al.*, 2007).

Paparan hewan pengerat ke HIK selama 28 hari meningkatkan peroksidasi lipid paru, kadar 3-nitrotirosin (3-NT), dan enzim prooksidan serta penurunan *mangan superoksida dismutase* (MnSOD) dan kadar alkalin CAT. Selain itu, Jin *et al.* (2016) melaporkan bahwa pemberian *procyanidin* biji anggur, ekstrak dengan sifat antioksidan, mencegah perkembangan *pulmonal hypertention* (PH) dan remodeling vaskular dalam model tikus HIK. Di sisi lain, beberapa penelitian menunjukkan bahwa pasien model PH hewan menunjukkan respon inflamasi. Faktor nuklir transkripsi κ B (NF- κ B) memainkan peran kunci dalam respon inflamasi dan aktivitasnya diatur oleh hipoksia. Faktanya, NF- κ B mengontrol ekspresi gen pro inflamasi. Selanjutnya, pemaparan hewan pengerat ke HIK selama 28 hari meningkatkan kadar protein paru NF- κ B dan sitokin pro-inflamasi TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-10. Temuan ini menunjukkan bahwa HIK mengaktifkan ROS atau/ dan jalur pensinyalan inflamasi di jaringan paru dan kedua faktor tersebut mungkin berperan dalam perkembangan PH yang diinduksi oleh HIK. Hipoksia intermiten kronis (HIK) meningkatkan ROS di paru dengan memisahkan kompleks III dari rantai transpor elektron mitokondria dan dengan meningkatkan kadar enzim pro-oksidan. Pemaparan tikus ke HIK selama 28 hari meningkatkan peroksidasi

lipid, nitrasi protein, dan tingkat pro-oksidan (NOX2 dan NOX4), dan menurunkan aktivitas enzim antioksidan seperti MnSOD, katalase, dan *homoxxygenase-1* (H2O-1) (Iturriaga & Castillo-Galán, 2019).

II.1.5. Stres Oksidatif dan Antioksidan

Stres oksidatif didefinisikan sebagai terjadinya ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan yang mengakibatkan terjadinya kerusakan molekuler dan gangguan pensinyalan redoks, hal ini dikaitkan dengan berbagai proses patologis dan diketahui memperburuk penyakit kronis (Debevec *et al.*, 2017). Keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan harus dijaga agar fisiologis sel berjalan dengan baik, jika terjadi perubahan pada sistem ini maka dapat meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan salah satu bentuk dari radikal bebas. Regulasi ROS penting untuk fisiologis yang tepat, jika terjadi perubahan konsentrasi ROS memiliki dampak signifikan pada keadaan fisiologis banyak sistem biologis (Zuo *et al.*, 2015).

Radikal bebas didefinisikan sebagai spesies kimia apa pun yang mengandung elektron tidak berpasangan di orbit terluarnya. Karena elektronnya tidak berpasangan maka radikal bebas sangat reaktif dan siap mengambil bagian dalam reaksi kimia dengan hampir semua komponen sel (lipid, protein, karbohidrat kompleks, dan asam nukleat) di dalam tubuh. Reaksi tersebut terjadi melalui rantai reaksi oksidatif hingga menyebabkan cedera jaringan. Untuk sebagian besar struktur biologis seperti lipid, protein, dan asam nukleat, kerusakan radikal bebas terkait erat dengan kerusakan oksidatif yang menyebabkan kerusakan langsung

pada seluler dengan menginduksi peroksidasi lipid dan asam nukleat (Aprioku and Har, 2013).

Beberapa jenis spesies reaktif penting lainnya juga memiliki dampak penting pada biologi redoks dan berakibat pada stres oksidatif seperti : *reactive nitrogen species* (RNS) *reactive sulfur species* (RSS) *reactive carbonyl species* (RCS), *reactive selenium species* (RSeS) (Helmut Sies, Carsten Berndt, 2017) dan *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan radikal bebas yang paling signifikan secara biologis berpusat pada oksigen (Aprioku *et al.*, 2013).

Setiap perubahan konsentrasi ROS memiliki dampak yang signifikan terhadap keadaan fisiologis, ROS juga bertanggung jawab atas respons seluler terhadap stresor karena ROS dapat menginduksi aktivasi NF- κ B, sebuah kompleks protein yang bertanggung jawab untuk mengontrol transkripsi DNA. Selain itu, ROS dapat mempengaruhi perubahan fungsi mitokondria, ekspresi protein stres tertentu dan aktivitas antioksidan. Konsentrasi ROS diturunkan oleh antioksidan (Zuo *et al.*, 2015). Pada sel eukariotik lebih dari 90% ROS diproduksi oleh mitokondria, sebagian besar ROS dihasilkan melalui pelepasan elektron dari rantai transpor elektron (Lushchak, 2014).

Reactive oxygen species (ROS) diwakili oleh molekul oksigen radikal bebas dan non-radikal bebas seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), superoksida (O_2^-), oksigen singlet ($1/2 O_2$), dan radikal hidroksil (OH). Radikal bebas endogen dan eksogen tidak dapat dihambat, karena proses metabolisme yang sedang berlangsung, dan aksi oksidan lingkungan. Radikal bebas dihasilkan dalam proses aerobik seperti respirasi sel, paparan infeksi mikroba yang melibatkan aktivasi

fagosit, selama aktivitas fisik intensif atau aksi polutan/toksin seperti asap rokok, alkohol, pengion dan radiasi UV, pestisida, dan ozon. ROS dalam jumlah rendah mewakili molekul pensinyalan, yang terlibat dalam regulasi proliferasi sel, apoptosis, dan ekspresi gen dengan memicu faktor transkripsi (Pisoschi & Pop, 2015).

Radikal bebas hidroksil (OH) peroksidasi lipid yang diinduksi dan hidroksilasi DNA juga merupakan jalur utama untuk kerusakan oksidatif. OH radikal adalah spesies paling reaktif yang diketahui secara kimiawi karena dapat menyerang dan merusak hampir setiap molekul yang ditemukan dalam sel hidup. OH radikal juga dapat memulai reaksi berantai dengan bereaksi dengan lipid membran yang menyebabkan peroksidasi lipid. Efek keseluruhan dari peroksidasi lipid adalah untuk mengurangi fluiditas membran, meningkatkan kebocoran membran, dan merusak protein membran, sehingga menonaktifkan reseptor, enzim, dan saluran ion (Biswas, 2016).

Membran sel memiliki struktur asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang tinggi dan sangat rentan terhadap kerusakan ROS, yang disebut "peroksidasi lipid". Peroksidasi lipid adalah proses di mana spesies radikal bebas seperti radikal oksil, radikal peroksil, dan radikal hidroksil menghilangkan elektron dari lipid dan kemudian menghasilkan intermediat reaktif yang dapat mengalami reaksi lebih lanjut. Peroksidasi lipid merusak fosfolipid secara langsung dan juga dapat bertindak sebagai sinyal kematian sel yang menginduksi kematian sel terprogram. Fosfolipid teroksidasi juga dapat memainkan peran penting dalam banyak penyakit inflamasi dan sering memediasi perubahan proinflamasi. Ferroptosis, ditemukan

sebagai bentuk baru dari kematian sel terprogram yang disebabkan oleh peroksidasi lipid (Su *et al.*, 2019).

Peroksidasi lipid dimetabolisme melalui jalur β -oksidasi menjadi *malondialdehyde* (MDA) dan *4-hidroksinonenal* (4-HNE). Konstituen lain dari membran sel, seperti asam amino atau protein, juga terlibat dalam proses peroksidasi lipid, namun berbeda dengan peroksidasi lipid, kecepatan reaksi ini melambat. Produk peroksidasi lipid, MDA dan 4-HNE, disarankan untuk digunakan sebagai indikator kerusakan jaringan yang bergantung pada ROS di berbagai organ (Kwiecien *et al.*, 2014).

Malondialdehyde (MDA) merupakan produk peroksidasi lipid dari membran sel akibat reaksi PUFA dan spesies radikal. Oleh karena itu, peroksidasi lipid menghasilkan hidroperoksida, yang mengalami fragmentasi untuk menghasilkan intermediet reaktif dengan panjang tiga karbon yang disebut MDA. Lebih khusus lagi, MDA adalah dialdehida reaktif (alkanedial) yang dicirikan oleh dua gugus karbonil (gugus umum R-CHO yang terdiri dari pusat karbonil yang terikat pada hidrogen) (Jov *et al.*, 2020).

Malondialdehyde (MDA) merupakan aldehida yang sangat reaktif dan paling mutagenik. Selain itu, MDA dapat menjadi konsekuensi pemecahan prostaglandin oleh aktivitas siklooksigenase atau melalui berbagai precursor non-lipid, yang melibatkan asam amino dan karbohidrat yang mampu menghasilkan MDA. *Malondialdehyde* (MDA) mampu berinteraksi dengan basa asam nukleat, membentuk adisi yang berbeda, dan juga dapat bereaksi dengan protein secara sinergis dan kovalen, menghasilkan adisi protein stabil yang selanjutnya

menghasilkan induksi respons imun yang kuat dan menunjukkan pro-fibrogenik dan proinflamasi. Selain itu, perakitan MDA mampu memodifikasi permeabilitas membran dan memperburuk fluiditas lapisan ganda lipid membran (Taso *et al.*, 2019). *Malondialdehyde* diyakini berasal dari kondisi stres dan memiliki kemampuan reaksi yang tinggi dengan banyak biomolekul seperti protein atau DNA yang mengarah pada pembentukan produk tambahan dan produksi MDA yang berlebihan dikaitkan dengan keadaan patologis (Ayala *et al.*, 2014).

Untuk mengurangi maupun mencegah terjadinya stres oksidatif diperlukan antioksidan, antioksidan merupakan zat yang secara langsung mengais ROS atau secara tidak langsung bertindak untuk meningkatkan pertahanan antioksidan atau menghambat produksi ROS (Gulcin, 2020). Antioksidan meredakan radikal bebas dan memainkan peran penting dalam menjaga fungsi seluler. Antioksidan terbagi menjadi dua, yaitu antioksidan eksogen dan antioksidan endogen. Antioksidan endogen dapat berupa enzimatis maupun non-enzimatis. Antioksidan enzimatis endogen terdiri dari glutathione peroksidase, superoksida dismutase (SOD) dan katalase sedangkan antioksidan non enzimatis adalah asam urat, asam lipoat, bilirubin, glutathione dan metatonin. Antioksidan eksogen adalah karotenoid, vitamin E, A dan C, flavonoid alami atau senyawa lainnya. Vitamin C adalah antioksidan yang larut dalam air yang bekerja bersama dengan vitamin E untuk melindungi lipid dari peroksidasi (Neha *et al.*, 2019).

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap kerusakan oksidatif beroperasi dalam dua sistem utama, yaitu: (1) penghapusan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif oleh enzim seperti superoksida dismutase (SOD), CAT, GPx, dll, (2) *Scavenging*

radikal bebas oleh donor elektron, seperti glutathione (GSH), tocoferol, asam askorbat, tioredoksin dll. Mekanisme lainnya termasuk pengikatan logam pro-oksidan ion seperti besi, tembaga oleh protein pengikat logam tertentu seperti transferrin, metallothionein, haptoglobin dan ceruloplasmin (Saqib *et al.*, 2020).

Superoksida dismutase (SOD) adalah metaloenzim yang ditemukan pada eukariota dan beberapa prokariota yang terlokalisasi dalam sitosol, intermembran mitokondria, matriks mitokondria, membran dalam dan kompartemen ekstraseluler. Superoksida dismutase (SOD) mengkatalisis dismutasi radikal bebas anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2) (Uses, 2021). SOD merupakan *scavenger* radikal bebas terpenting dan terbaik dalam organisme serta menjaga keseimbangan metabolisme (Shi *et al.*, 2021). Berdasarkan kofaktor yang berbeda, enzim SOD alami dibagi menjadi empat jenis: SOD tembaga-seng (CuZnSOD), SOD mangan (MnSOD), SOD besi (FeSOD), dan SOD nikel (NiSOD) (Yan & Fan, 2021).

Antioksidan endogen merupakan protein yang diproduksi oleh tubuh dan dapat berupa enzimatik maupun non enzimatik. Sedangkan antioksidan eksogen adalah antioksidan yang diperoleh dari sumber eksternal (luar tubuh). Antioksidan eksogen penting yang berperan dalam perlindungan dari radikal bebas antara lain vitamin E, vitamin C, vitamin A, polifenol, dan beberapa mineral. Antioksidan eksogen diperoleh dalam makanan melalui makanan seperti buah-buahan dan sayuran atau melalui suplemen makanan (Higgins & Izadi, 2020).

Vitamin E (tokoferol) merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan memiliki sifat antioksidan untuk melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan yang

diakibatkan oleh radikal bebas dan ROS. Vitamin E secara alami terdapat di dalam berbagai makanan termasuk sayuran hijau dan makanan berlemak seperti minyak sayur, biji-bijian, kacang-kacangan dan kuning telur. Vitamin E merupakan nama generik dari tokoferol. Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang dapat ditemukan di membran plasma yang bekerja sebagai pemutus rantai dalam peroksidasi lipid membran sel dengan cara bisa langsung *scavenging* melibatkan radikal lipoperoksil dan melindungi membran sel terhadap lipid peroksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen ke radikal. Radikal tokoferil teroksidasi kemudian diubah kembali melalui jalur yang difasilitasi asam askorbat ke tokoferol (Gulcin, 2020). Vitamin E juga dapat membantu dalam pemeliharaan integritas membran, menjaga transduksi sinyal dan produksi protein utama dan mediator lainnya dan secara langsung mempengaruhi fungsi sel kekebalan, karena sel kekebalan sangat bergantung pada komposisi dan struktur membran sel yang merupakan tempat utama sinyal membran diterjemahkan melalui mekanisme transduksi sinyal yang berbeda ke plasma dan nukleus untuk memodulasi gen pengatur utama (Lewis *et al.*, 2019).

Selain vitamin E, antioksidan eksogen juga dapat berupa flavonoid. Flavonoid adalah bagian dari fitonutrien kelas polifenol. Flavonoid memiliki beberapa efek biokimia dan antioksidan yang terkait dengan aplikasi farmasi, obat-obatan dan kosmetik. Hal ini karena flavonoid memiliki aktivitas anti-oksidatif, anti-inflamasi, anti-mutagenik, antimikroba, anti-karsinogenik, vaskular yang kuat, kemampuan pemulungan radikal bebas. Flavonoid adalah zat fenolik yang tersebar luas di semua tanaman vaskular. Flavonoid adalah kelompok beragam fitonutrien

(bahan kimia tanaman) yang terdapat di banyak buah, sayuran, dan tanaman obat di mana mereka muncul sebagai bentuk bebas, glikosida, serta turunan termetilasi (Karak, 2019).

II.1.6. Pangan Fungsional

Ilmu pangan berawal dari kolaborasi antara ilmu pengetahuan dan kebutuhan masyarakat yang merupakan perpaduan antara ilmu pangan, nutrisi, dan obat-obatan. Secara khusus, para peneliti mempelajari komponen makanan dan manfaatnya yang memberikan efek terhadap kesehatan. Mereka melakukan pengukuran terhadap perubahan kesehatan dan perilaku homeostatis melalui penggunaan biomarker atau indikator di dalam tubuh. Dari penelitian ini para ilmuwan makanan fungsional menentukan efek kesehatan dan dosis yang tepat/aman dari makanan fungsional tersebut (Martirosyan & Singh, 2015).

Pangan fungsional didefinisikan sebagai makanan yang mengandung nutrisi atau senyawa bioaktif tertentu yang dapat mengatasi beberapa mekanisme fisiologis tubuh kita yang memberikan manfaat. Yang dimaksud dengan “fungsional” adalah pangan yang dikonsumsi secara teratur untuk memberikan manfaat fisiologi atau mengurangi risiko penyakit kronis disamping fungsi gizi dasarnya. Buah-buahan, sayuran, polong-polongan, kacang-kacangan, rempah-rempah, minyak zaitun, minyak mustard, minyak canola, dan minyak biji rami adalah makanan fungsional umum yang telah digunakan untuk pengelolaan obesitas, sindrom metabolik, diabetes tipe 2, dan CVD. Makanan ini kaya akan asam amino esensial dan nonesensial, asam lemak omega-3, asam lemak tak jenuh tunggal, antioksidan,

vitamin, dan mineral yang diketahui dapat melindungi dari CVD dan penyakit kronis lainnya (Silveira and Mellado, 2014; Tripathi *et al.*, 2018).

Pangan fungsional yang kaya akan senyawa bioaktif telah terbukti dapat menekan inflamasi, mengurangi resiko kanker, kardiovaskular, dan gangguan pada sistem organ lainnya. Inflamasi adalah dasar utama bagi berbagai kondisi patologis baik akut maupun kronik, dan beberapa penelitian telah mengungkapkan berbagai senyawa bioaktif dalam pangan fungsional sanggup mencegah, mengurangi derajat maupun mengatasi kondisi inflamasi melalui jalur antioksidan dan antiinflamasi (Soumya *et al.*, 2021).

Jenis-jenis pangan fungsional adalah: (1) pangan biasa dengan zat bioaktif alami (misalnya, serat makanan), (2) pangan yang dilengkapi dengan zat bioaktif (misalnya, probiotik, antioksidan), dan (3) bahan pangan turunan yang diperkenalkan pada pangan konvensional (misalnya prebiotik). Makanan fungsional bukanlah obat-obatan seperti pil atau kapsul tetapi dikonsumsi sebagai bagian dari makanan sehari-hari (Al-Sheraji *et al.*, 2013).

Salah satu contoh pangan fungsional adalah *Ficus carica* (buah ara), buah ini sering muncul dipasaran dalam bentuk segar maupun kering. Peningkatan pemanfaatan buah ara dikaitkan dalam pengembangan makanan dan minuman fungsional berkontribusi pada pola makan yang lebih sehat karena buah ara yang kaya akan sumber vitamin (terutama thiamin dan riboflavin), gula, karbohidrat, mineral dan asam organik. Selain itu buah ara segar maupun kering merupakan sumber serat dan senyawa fenolik (Ayuso *et al.*, 2022).

II.1.7. Ficus carica

Ficus carica umumnya dikenal sebagai buah ara (gambar 7) merupakan buah musiman yang berasal dari Asia Kecil, Persia, Suriah, dan wilayah Mediterania. Ficus merupakan anggota famili Moraceae yang meliputi salah satu marga utama angiospermae dengan kurang lebih 800 spesies pohon, perdu, hemiepifit, pemanjat, dan tanaman merambat di daerah tropis dan subtropik (Rahmani & Aldebasi, 2017; Abdel-rahman *et al.*, 2021; Nuri & Uddin, 2021).



Gambar 7. *Ficus carica* (buah ara) (dikutip dari: Nuri and Uddin, 2021)

Berikut ini merupakan klasifikasi taksonomi dari *F.carica* :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales

Famili : Moraceae

Genus : *Ficus*

Spesies : *Ficus carica* (Nuri & Uddin, 2021)

Ficus tersebar di wilayah tropis dunia menunjukkan konsentrasi spesies tertinggi di wilayah Asia-Australia, dengan lebih dari 66% dari total spesies, dan keanekaragaman maksimumnya di daratan Asia dan Kalimantan. Pohon ara (*Ficus carica* L.) adalah satu-satunya anggota genus ini yang memiliki distribusi di Mediterania. Di hutan hujan tropis, buah ara memiliki peran fundamental dalam ekosistem, bagian buah dari tanaman ini menjadi sediaan makanan bagi serangga, burung, dan hewan lain sepanjang tahun (Falistocco, 2020).

Buah ara adalah buah padat energi dan bergizi dengan serat dan mineral yang baik (Saleem, 2022). Banyak studi tentang *F. carica* yang membuktikan adanya bahwa tanaman ini memiliki berbagai senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, pitosterol, asam organik, komposisi antosianin, triterpenoid, kumarin, dan senyawa volatil seperti karbonat, alkohol alifatik. Senyawa fenolik, asam organik, dan senyawa volatil sangat umum di sebagian besar kultivar. Hampir semua bagian dari *F. carica* telah dilaporkan dengan lebih dari satu nilai obat dan hampir setiap bagian dilaporkan memiliki aktivitas antikanker terhadap berbagai jenis kanker. Senyawa fenolik memiliki manfaat bagi kesehatan manusia, karena mampu bertindak sebagai antioksidan, konsumsi makanan yang mengandung senyawa ini dikaitkan dengan hasil kesehatan yang baik (Mousa *et al.*, 2021).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Nuri & Uddin, 2021), buah *F. carica* segar mengandung 79% air, 19% karbohidrat, 1% protein dan terdapat

kandungan lemak yang dapat diabaikan. Berikut ini merupakan nilai nutrisi pada buah *F. carica*:

Tabel 1. Nutrisi yang terkandung didalam buah *Ficus carica* (Nuri & Uddin, 2021)

Nilai nutrisi per 100 gram buah <i>Ficus carica</i>	
Energi	310 kJ (74 kcal)
Karbohidrat	19,2 g
Gula	16,3 g
Serat	3 g
Lemak	0,3 g
Protein	0,8 g
Vitamin A	7 µg
Thiamin (B1)	0,06 mg
Riboflavin (B2)	0,05 mg
Niacin (B3)	0,4 mg
Asam pantotenik (B5)	0,3 mg
Vitamin B6	0,1 mg
Folat (B9)	6 µg
Vitamin C	2 mg
Vitamin E	0,11 mg
Vitamin K	4,7 µg
Kalsium	35 mg
Zat besi	0,4 mg
Magnesium	17 mg
Manganese	0,13 mg
Phosphorus	14 mg
Potassium	232 mg
Sodium	1 mg
Zinc	0,15 mg
Water	79 g

Buah ara segar dapat dikonsumsi secara langsung dengan kulit dikupas maupun tidak dikupas, pada kondisi lingkungan hidup pascapanennya adalah 7–10 hari. Umur simpan dapat ditingkatkan hingga 2-3 minggu dengan penyimpanan di tempat penyimpanan dingin. Buah ara juga sangat populer sebagai produk kering-organik karena pengeringannya mengurangi daya simpannya (Hajam & Saleem, 2022).

Mengonsumsi buah ara dapat meningkatkan kemampuan antioksidan plasma manusia. Jumlah polifenol dan antosianin dalam buah ara segar terkait dengan kapasitas antioksidan mereka secara keseluruhan. Radikal bebas merupakan racun lingkungan, termasuk yang mempengaruhi manusia. Antioksidan dapat membantu mencegah atau meminimalkan kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas (Rasool *et al.*, 2023).

Studi fitokimia pada buah ara telah mengungkapkan adanya ceramide, cerebrosides, steroid, triterpen pentasiklik, flavonoid dan senyawa fenolik. Antioksidan yang terdapat dalam buah ara adalah α -tokoferol, flavonoid dan senyawa fenolik yang meningkatkan aktivitas antioksidannya. Kapasitas antioksidan tinggi karena adanya polifenol dan antosianin dalam buah ara. Antioksidan tinggi yang terkandung didalam buah ara dapat digunakan sebagai terapeutik potensial seperti antiinflamasi, aktivitas antikanker, antiapoptik, dan antijamur (Hajam & Saleem, 2022).

II.2. Landasan Teori

Hipoksia merupakan kondisi ketika jaringan mengalami kekurangan oksigen seluler yang akan mengaktivasi gen HIF-1 α dan menyebabkan peningkatan transkripsi sejumlah gen, seperti VEGF, EPO, dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang berpartisipasi dalam respons adaptif terhadap hipoksia dengan meningkatkan perfusi jaringan dan oksigenasi sehingga dapat membantu pemulihan dari serangan awal hipoksia. Pada kondisi hipoksia terjadi pengurangan produksi energi yang memiliki dampak negatif pada laju translasi protein, karena hipoksia

dan HIF-1 α menghambat pensinyalan mTOR, yang merupakan jalur pensinyalan yang terlibat dalam induksi pertumbuhan sel dan sintesis protein.

Pensinyalan hipoksia dan aktivasi HIF memiliki efek anti dan proinflamasi untuk mengatur aktivitas sel imun. Sel imun yang mengalami stimulasi akan mengubah aktivitas metabolisme untuk memperoleh fenotipe yang dikaitkan dengan relung imunologis patologis seperti neutrofil yang diaktifkan untuk meningkatkan penggunaan oksigen, sedangkan makrofag dan limfosit meningkatkan glikolisis sehingga mengakibatkan terjadinya penurunan jumlah oksigen lokal yang mengarah ke aktivasi pensinyalan HIF dan modulasi aktivitas imun.

Pada hipoksia intermiten, oksigen seluler yang sedikit tidak cukup untuk menstabilisasi HIF-1 α . Peningkatan ekspresi HIF-1 α menyebabkan aktivasi NF κ B yang berperan dalam respon inflamasi melalui stres mitokondria yang memicu produksi mediator inflamasi seperti TNF- α . Beberapa penelitian menemukan bahwa dalam proses patologis hipoksia reoksigenasi banyak menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) yang mengarah pada terjadinya stres oksidatif dalam tubuh.

Hipoksia lokal dan stres oksidatif bersama-sama memediasi kerusakan, menyebabkan apoptosis sel normal dan mengaktifkan jalur respon inflamasi pada pola molekuler terkait kerusakan akibat inflamasi bakteri sehingga mengaktifkan respon imun bawaan. Stres oksidatif teraktivasi pada saat hipoksia intermiten kronis menyebabkan serangkaian respons inflamasi dan pelepasan sitokin inflamasi, yang mengakibatkan cedera paru dan peradangan paru.

Peningkatan HIF-1 α akibat dari hipoksia intermiten kronis menyebabkan stres oksidatif melalui peningkatan ROS. Radikal bebas didefinisikan sebagai spesies kimia yang mengandung elektron tidak berpasangan di orbit terluarnya. Karena elektronnya tidak berpasangan maka radikal bebas sangat reaktif dan siap mengambil bagian dalam reaksi kimia dengan hampir semua komponen sel (lipid, protein, karbohidrat kompleks, dan asam nukleat) di dalam tubuh. Reaksi tersebut terjadi melalui rantai reaksi oksidatif hingga menyebabkan cedera jaringan.

Membran sel memiliki struktur *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang tinggi dan sangat rentan terhadap kerusakan ROS yang disebut peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses ketika spesies radikal bebas seperti radikal oksil, radikal peroksil, dan radikal hidroksil menghilangkan elektron dari lipid dan kemudian menghasilkan intermediat reaktif yang dapat mengalami reaksi lebih lanjut. Peroksidasi lipid merusak fosfolipid secara langsung dan juga dapat bertindak sebagai sinyal kematian sel yang menginduksi kematian sel terprogram.

Peroksida lipid dimetabolisme melalui jalur β -oksidasi menjadi *malondialdehyde* (MDA) dan 4-hidroksinonenal (4-HNE). *Malondialdehyde* merupakan produk peroksidasi lipid dari membran sel akibat reaksi PUFA dan spesies radikal. Oleh karena itu, peroksidasi lipid menghasilkan hidroperoksida, yang mengalami fragmentasi untuk menghasilkan intermediat reaktif dengan panjang tiga karbon yang disebut MDA. *Malondialdehyde* merupakan aldehida yang sangat reaktif dan beracun yang mampu berinteraksi dengan basa asam nukleat, membentuk adisi yang berbeda, dan juga dapat bereaksi dengan protein secara sinergis dan kovalen, menghasilkan adisi protein stabil yang selanjutnya

menghasilkan induksi respons imun yang kuat dan menunjukkan pro-fibrogenik dan proinflamasi. Selain itu, perakitan MDA mampu memodifikasi permeabilitas membran dan memperburuk fluiditas lapisan ganda lipid membran (Kwiecien *et al.*, 2014; Taso *et al.*, 2019; Jov *et al.*, 2020).

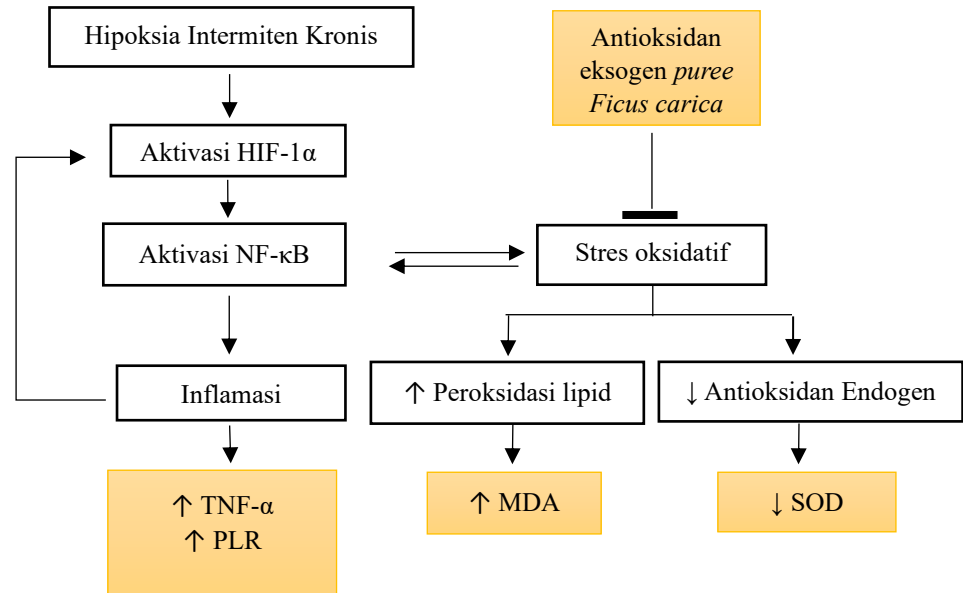
Mekanisme pertahanan tubuh terhadap kerusakan oksidatif beroperasi dalam dua sistem utama, yaitu: (1) penghapusan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif oleh enzim seperti superoksida dismutase (SOD), CAT, GPx, dll, (2) *Scavenging* radikal bebas oleh donor elektron, seperti glutathione (GSH), tocoferol, asam askorbat, tioredoksin dll. Superoksida dismutase (SOD) adalah metaloenzim yang ditemukan pada eukariota dan beberapa prokariota yang terlokalisasi dalam sitosol, intermembran mitokondria, matriks mitokondria, membran dalam dan kompartemen ekstraseluler. SOD mengkatalisis konversi radikal bebas anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2).

Makanan yang memiliki kandungan nutrisi atau senyawa bioaktif tertentu dapat mengatasi beberapa mekanisme fisiologis tubuh dan memberi manfaat kesehatan disebut pangan fungsional. Fungsional yang dimaksud adalah pangan yang dapat dikonsumsi teratur dan dapat memberikan manfaat kesehatan seperti mengurangi resiko penyakit kronis. Makanan yang kaya akan asam amino esensial dan non-esensial, asam lemak omega-3, asam lemak tak jenuh tunggal, antioksidan, vitamin, dan mineral dapat melindungi dari penyakit kardiovaskular dan penyakit kronis lainnya. Makanan yang mengandung senyawa di atas seperti buah-buahan, sayuran, kacang, rempah, minyak zaitun, minyak canola dan lainnya telah digunakan untuk pengelolaan obesitas, diabetes tipe 2, dan penyakit kardiovaskular.

Ficus carica merupakan salah satu contoh pangan fungsional yang dapat dikonsumsi dalam bentuk segar maupun kering. Peningkatan pemanfaatan buah ara dikaitkan dalam pengembangan makanan dan minuman fungsional berkontribusi pada pola makan yang lebih sehat karena buah ara yang kaya akan sumber vitamin (terutama thiamin dan riboflavin), gula, karbohidrat, mineral dan asam organik. Selain itu buah ara segar maupun kering merupakan sumber serat dan senyawa fenolik. Buah ara merupakan buah yang memiliki berbagai senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, pitosterol, asam organik, komposisi antosianin, triterpenoid, kumarin, dan senyawa volatil seperti karbonat, alkohol alifatik.. Hampir semua bagian dari *F. carica* telah memiliki lebih dari satu nilai obat dan hampir setiap bagian memiliki aktivitas antikanker terhadap berbagai jenis kanker. Senyawa fenolik bertindak sebagai antioksidan sehingga bermanfaat bagi kesehatan manusia.

Mengonsumsi buah ara dapat meningkatkan kemampuan antioksidan plasma manusia. Jumlah polifenol dan antosianin dalam buah ara segar terkait dengan kapasitas antioksidan mereka secara keseluruhan. Radikal bebas merupakan racun lingkungan, termasuk yang mempengaruhi manusia. Antioksidan dapat membantu mencegah atau meminimalkan kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas.

II.3 Kerangka Teori



Keterangan:

—| = Menghambat

 = Diteliti

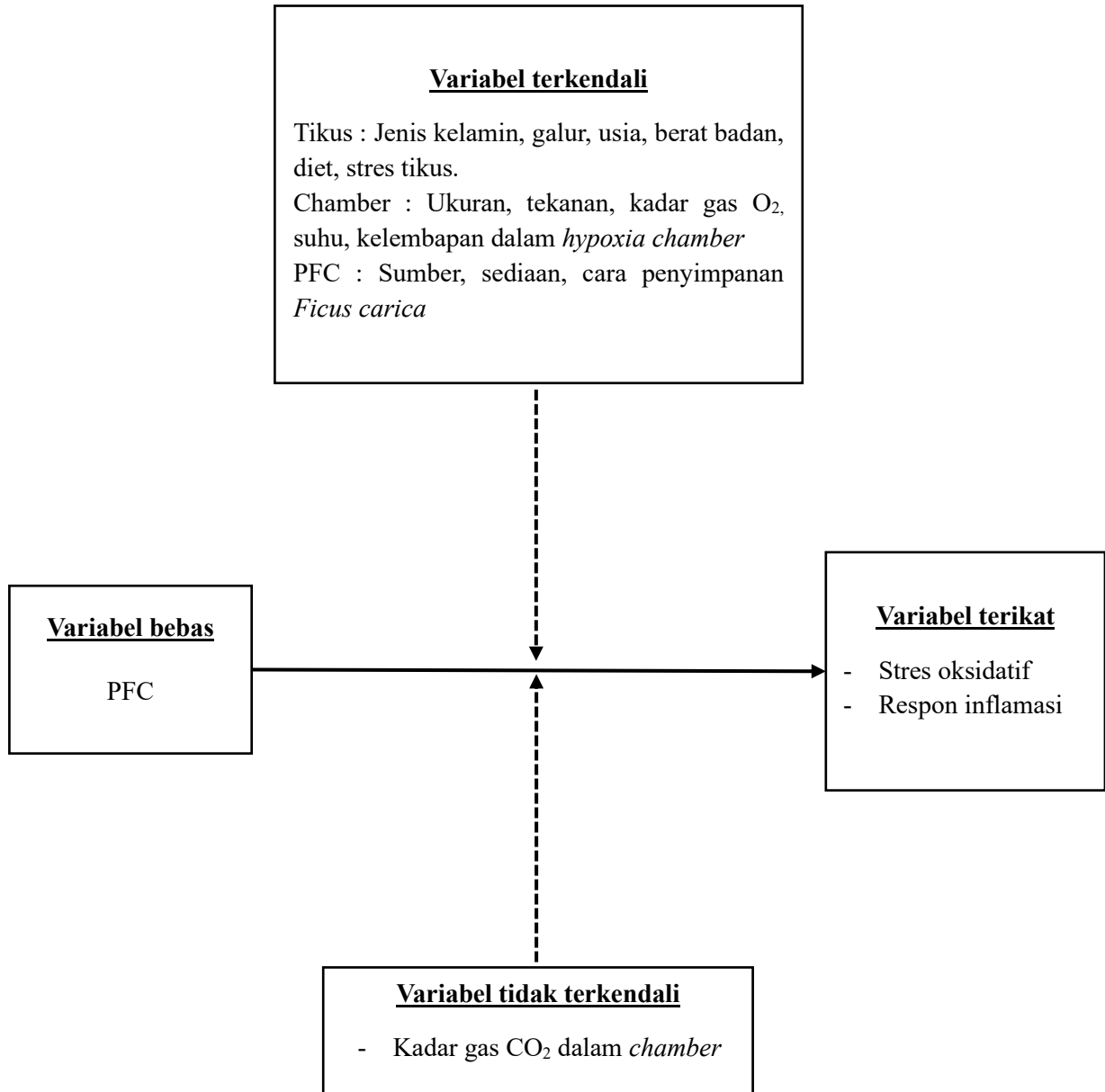
↓ = Menurun

↑ = Meningkatkan

→ = Menginduksi

Gambar 8. Kerangka Teori

II.4 Kerangka Konsep



Gambar 9. Kerangka Konsep

II.5 Hipotesis

1. Kadar MDA pada jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis lebih rendah pada kelompok yang diberikan intervensi *puree Ficus carica* dibandingkan kelompok tanpa intervensi.
2. Kadar SOD pada jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis lebih tinggi pada kelompok yang diberikan intervensi *puree Ficus carica* dibandingkan kelompok tanpa intervensi.
3. Kadar Rasio SOD/MDA pada jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis lebih tinggi pada kelompok yang diberikan intervensi *puree Ficus carica* dibandingkan kelompok tanpa intervensi.
4. Kadar *Platelet Lymphocyte Ratio* (PLR) darah pada *post test* tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis lebih rendah pada kelompok yang diberikan *puree Ficus carica* dibandingkan kelompok tanpa intervensi.
5. Kadar TNF- α pada jaringan paru tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi hipoksia intermiten kronis lebih rendah pada kelompok yang diberikan intervensi *puree Ficus carica* dibandingkan kelompok tanpa intervensi.

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan desain *pre-post test control* dan *post-test control design*. Subjek yang digunakan adalah tikus jantan galur *Sprague Dawley* (SD) yang diinduksi hipoksia intermitten kronis dan diberikan *puree Ficus carica* (PFC) selama 30 hari. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Departemen Fisiologi, FK-KMK UGM pada bulan Juli-Agustus 2023. Analisis sampel darah dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Biologi UGM dan analisis sampel homogenat jaringan paru dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. *Ethical clearence* penelitian ini menginduk pada penelitian Hibah Dana Masyarakat (DAMAS) yang berjudul "Peran Buah Tin (*Ficus carica*): Antioksidan Penangkal Stres Oksidatif Akibat Induksi Hipoksia-Reoksigenasi" yang terdaftar pada komisi etik FK-KMK Universitas Gadjah Mada dengan nomor registrasi KE/FK/0362/EC/2023.

III.2. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari :

1. Variabel bebas yaitu pemberian PFC.
2. Variabel terikat yaitu stres oksidatif dan inflamasi jaringan paru.
3. Variabel terkontrol :
 - a. Tikus : Spesies, jenis kelamin, usia, dan berat badan tikus, diet, dan stres.

- b. *Hypoxia chamber* : kadar gas O₂, tekanan dan suhu.
4. Variabel tidak terkendali yaitu kadar CO₂ di dalam *hypoxia chamber*.

III.3. Definisi Operasional

1. *Ficus carica* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan buah ara yang didapatkan dari perkebunan Ciwidey Bandung dengan budidaya buah ara yang berasal dari Yordania. Sediaan buah ara yang digunakan dalam penelitian ini adalah *puree* yang diperoleh dari menghaluskan keseluruhan buah yang meliputi kulit buah, daging buah dan biji. Pembuatan *puree Ficus carica* (PFC) dilakukan dengan cara menghaluskan buah ara menggunakan *homogenyzer*, *puree* yang didapat diberikan secara *force feeding* kepada hewan coba dengan dosis yang sesuai dengan kelompok perlakuan. *Puree Ficus carica* yang diberikan pada tikus berskala numerik (mL/200grBB/hari) (Meliala *et al.*, 2024).
2. Hipoksia intermiten kronis merupakan suatu kondisi hipoksia yang terdiri dari siklus normoksia dan hipoksia yang berulang (Song *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018) dan pada penelitian ini dilakukan selama 30 hari. Hipoksia intermiten kronis pada penelitian ini dilakukan selama 4 jam dengan memaparkan tikus pada keadaan hipoksia dengan konsentrasi gas oksigen 10% dan nitrogen 90% yang kemudian dilanjutkan proses reoksigenasi pada konsentrasi oksigen 21% atau normoksia selama 20 jam (Meliala *et al.*, 2024) Konsentrasi oksigen ini diukur menggunakan *oxygen analyzer* dalam skala numerik (%).
3. Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang menyebabkan gangguan pensinyalan dan kontrol redoks dan/atau

kerusakan molekuler (Sies, 2018). Stres oksidatif dinilai melalui kadar MDA (*Molondialdehyde*), SOD, rasio SOD/MDA pada homogenat paru tikus pada *post* intervensi dengan menggunakan metode ELISA mengikuti protokol *ELISA Kit FineTest® No. EU2577* untuk kadar MDA dan *ELISA Kit FineTest® No. ER1950* untuk kadar SOD dalam satuan ng/mL dengan skala numerik.

4. Inflamasi paru merupakan respon imun paru yang ditandai melalui perubahan kadar PLR pada *pre* dan *post* intervensi dengan menganalisis darah menggunakan *hematology analyzer* dengan skala numerik lalu PLR dihitung dengan membagi jumlah platelet dengan jumlah limfosit (Kurtul & Ornek, 2019). Kadar TNF- α pada homogenat paru tikus *post* intervensi yang akan dianalisis dengan metode ELISA dengan mengikuti protokol *EliKine™ Rat TNF- α ELISA Kit No. KTE9007* dalam satuan ng/mL dengan skala numerik.

III.4. Alat dan Bahan

III.4.1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus dengan spesies *Rattus norvegicus* berjenis kelamin jantan dengan galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Peternakan Hewan Uji, Sleman, Yogyakarta. Subjek penelitian di pilih dengan menggunakan metode *purposing sampling* dengan kriteria restriksi yaitu:

1. Kriteria inklusi: Tikus galur *Sprague-Dawley* berjenis kelamin jantan, berusia 12 minggu, berat badan ± 200 gram, dan bergerak dengan aktif.
2. Kriteria eksklusi: Tikus tidak sehat.

Estimasi besar sampel minimum penelitian ini ditetapkan melalui perhitungan menggunakan rumus *Federer* sebagai berikut :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$n \geq 15+55$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n : jumlah sampel

t : jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas didapatkan estimasi besar sampel minimum penelitian ini adalah 4 ekor tikus dengan tambahan 1 ekor untuk setiap kelompok sebagai cadangan sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk 6 kelompok dalam penelitian ini berjumlah 30 tikus.

III.4.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Kandang tikus berukuran 40x30x20 cm³ dengan kapasitas dua ekor tikus perkandang
2. *Hypoxia chamber* dengan ukuran 35 x 20 x 20 cm³ berbahan akrilik dengan ketebalan 3 mm
3. *Thermometer* dan *hygrometer* digital didalam *hypoxia chamber*
4. Tabung *mixing* untuk mengatur gas dengan konsentrasi O₂ 10% dan N₂ 90%
5. *Oxygen analyzer*
6. Tabung gas oksigen dan tabung gas nitrogen

7. Timbangan hewan
8. *Thermometer* ruangan
9. Manometer digital
10. Alat sonde untuk *force feeding*
11. *Cool box* dan *ice pack*
12. Lemari pendingin
13. *Blender* dan *homogenizer* untuk persiapan pembuatan *puree Ficus carica*

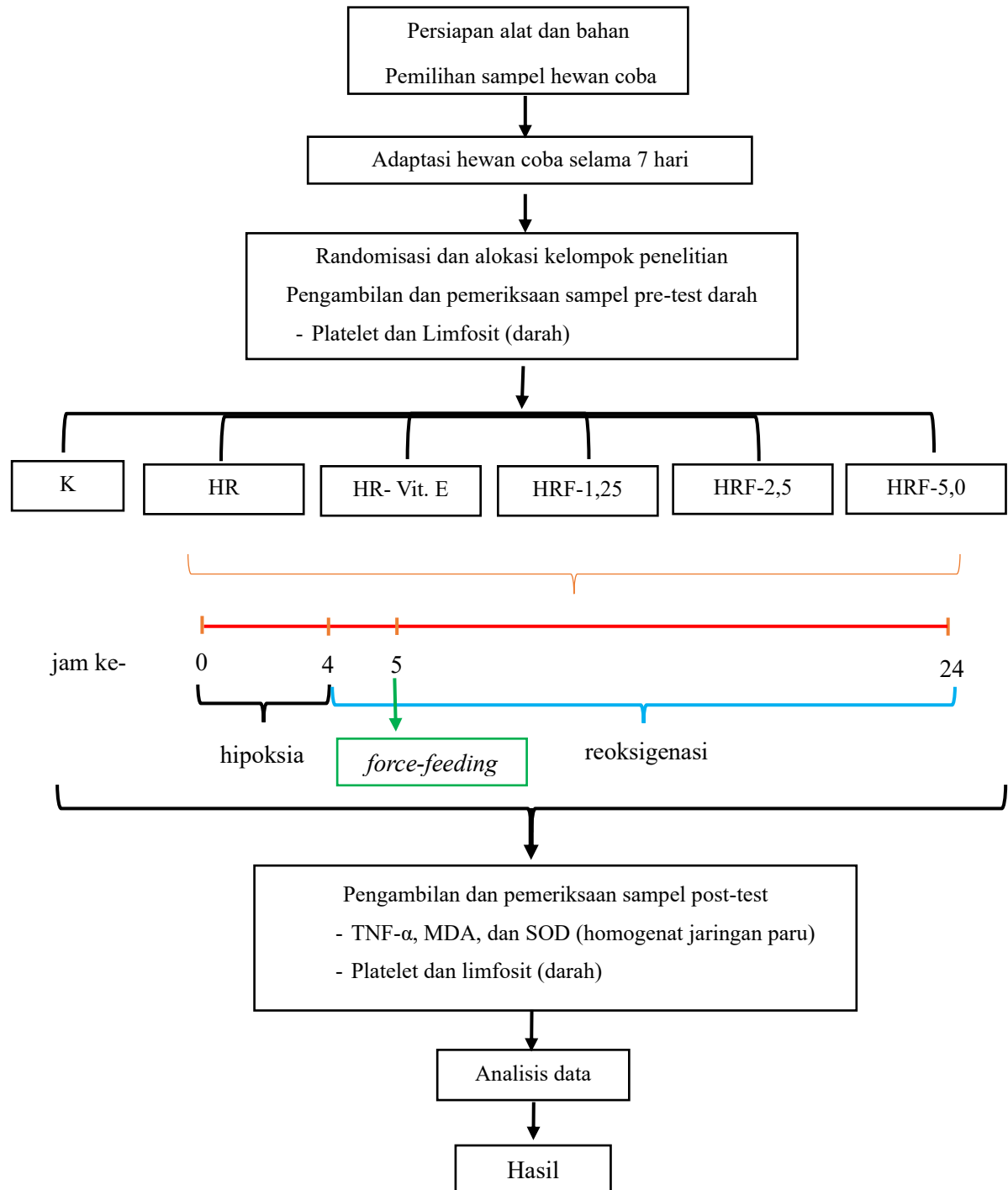
Peralatan bedah dan analisis sampel.

III.4.3. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Pakan standar Rat Bio® yang mengandung karbohidrat sebanyak 60%, protein 20%, lemak 4%, serat kasar 4%, kalsium 12%, dan fosfor 0,7%.
2. Air minum akan diberikan secara *ad libitum*
3. *Puree Ficus carica*
4. Vitamin E dan minyak jagung
5. Ketamine
6. Gas oksigen dan gas nitrogen
7. Cairan fisiologis PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
8. Sduit 1 cc
9. Tabung *Eppendorf* 1,5 ml
10. Tabung hematokrit
11. MDA *homogenate ELISA kit*
12. SOD *homogenate ELISA kit*
13. TNF- α *homogenate ELISA kit*

III.5. Jalannya Penelitian



Gambar 10. Skema Penelitian

III.5.1. Adaptasi dan Persiapan Subjek Penelitian

Sebelum diberi perlakuan, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari di Laboratorium Hewan Coba Departemen Fisiologi FK-KMK UGM. Tikus ditempatkan didalam kandang plastik berukuran 40x30x20 cm³ dengan kapasitas dua ekor tikus perkandang. Kandang berisi alas sekam yang diganti secara berkala. Ruang yang digunakan untuk tempat pemeliharaan tikus bersuhu 22-24°C, memiliki kelembapan sekitar 45-65%, pengaturan siklus gelap terang 12:12 perhari. Tikus diberi pakan rat bio sebanyak 20 gram/hari dan air minum secara *ad libitum*.

Setelah masa aklimatisasi, tikus dibagi menjadi enam kelompok menggunakan randomisasi dengan teknik *simple random sampling*. Enam kelompok perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol netral yang tidak akan diberikan perlakuan apapun baik hipoksia intermiten kronis maupun PFC.
2. Kelompok kontrol negatif yang akan diinduksi hipoksia intermiten kronis.
3. Kelompok kontrol positif yang akan diinduksi hipoksia intermiten kronis dan vitamin E dengan dosis 0,08mL/200grBB/hari.
4. Kelompok intervensi yang akan diinduksi hipoksia intermiten kronis dan diberi *puree Ficus carica* dengan dosis 1,25 mL/200grBB/hari.
5. Kelompok intervensi yang akan diinduksi hipoksia intermiten kronis dan *puree Ficus carica* dengan dosis 2,5 mL/200grBB/hari.
6. Kelompok intervensi yang akan diinduksi hipoksia intermiten kronis dan *puree Ficus carica* dengan dosis 5 mL/200grBB/hari.

Tabel 2. Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol	(-) hipoksia (-) reoksigenasi
HR	(+) hipoksia (+) reoksigenasi
HR-VitE	(+) hipoksia (+) reoksigenasi (+) 0.08mL/200grBB/hari Vit. E
HRF-1,25	(+) hipoksia (+) reoksigenasi (+) 1,25 mL/200grBB/hari <i>puree F. carica</i>
HRF-2,5	(+) hipoksia (+) reoksigenasi (+) 2,5 mL/200grBB/hari <i>puree F. carica</i>
HRF-5	(+) hipoksia (+) reoksigenasi (+) 5 mL/200grBB/hari <i>puree F. carica</i>

III.5.2. Persiapan *Puree Ficus carica*

Buah *F.carica* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari perkebunan ciwidey, kabupaten bandung. Dosis pemberian PFC ditentukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Meliala *et al.* (2024) yang menggunakan dosis bertingkat 0,5:1:2 kali dari dosis optimal, sehingga dosis PFC yang digunakan pada penelitian ini menjadi 1,25:2,5:5 ml/200grBB/hari dengan volume pemberian 5 mL dengan penambahan air. Pemberian dosis dari sediaan PFC juga menyesuaikan ukuran kapasitas volume lambung tikus dengan BB 200gram yaitu maksimal 5 mL.

Puree Ficus carica (PFC) yang digunakan pada penelitian ini terbuat dari buah segar yang di haluskan secara keseluruhan meliputi kulit, daging dan biji buah menggunakan *blender* dan dihomogenisasi menggunakan *homogenyzer* dengan kecepatan 8033 rpm selama 20 menit, merk *homogenyzer* yang digunakan adalah Armfield L4R. Sediaan PFC yang telah dipersiapkan di tempatkan dan disimpan kedalam wadah sesuai dengan kelompok dosis, kemudian disimpan ke dalam

lemari pendingin yang memiliki suhu 4°C. Proses pembuatan ini dilakukan setiap 2 hari sekali.

III.5.3. Persiapan vitamin E

Vitamin E adalah salah satu nutrisi paling efektif yang diketahui memodulasi fungsi kekebalan tubuh yang memiliki efek perlindungan terhadap oksidasi asam lemak tak jenuh terhadap kerusakan oksidatif akibat aktivitas metabolisme yang tinggi (Lewis *et al.*, 2019). Pada penelitian ini vitamin E yang digunakan adalah vitamin E jenis bubuk (Vitamin E dry powder EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eru,BP,USP batch F2167059) dengan dosis 200mg/KgBB/hari (Helmut Sies, Carsten Berndt, 2017). Vitamin E yang akan diberikan kepada hewan coba sebanyak 0.08 gr/200grBB/hari dan dilarutkan menggunakan minyak jagung dengan merk Tropicana Slim® sebanyak 0,1 mL dengan volume pemberian ke tikus adalah 5 mL.

III.5.4. Induksi hipoksia intermiten kronis

Pada penelitian ini hipoksia intermiten kronis yang diinduksikan pada tikus menggunakan *hypoxia chamber* dengan ukuran 35x20x20 cm³. *Hypoxia chamber* dikondisikan memiliki kandungan gas oksigen dengan konsentrasi rendah yaitu sebesar 10%, kandungan yang ada di dalam *hypoxia chamber* yaitu campuran dari 10% oksigen dan 90% nitrogen. Pencampuran oksigen dan nitrogen ini dilakukan didalam tabung *mixing*. Tabung *mixing* memiliki prinsip kerja mengganti air yang sudah di isi kedalamnya dengan gas yang di alirkan masuk kedalam tabung *mixing*. Pengisian gas oksigen dan gas nitrogen dilakukan bergantian sesuai dengan ketentuan konsentrasi oksigen 10% dan nitrogen 90%.

Campuran gas yang sudah ada didalam tabung *mixing* di alirkan ke dalam *hypoxia chamber* yang sudah dimasukkan satu ekor tikus. Induksi hipoksia dilakukan selama 4 jam/hari dengan tekanan normobarik yang di pantau menggunakan manometer digital. Kondisi tikus saat diinduksi hipoksia dipantau menggunakan *clinical health scoring*. Jika selama proses induksi hipoksia salah satu poin dari *clinical health scoring* bernilai 3 atau terakumulasi secara keseluruhan berjumlah >5, maka tikus tersebut akan di-*drop out* dalam penelitian.

Setelah 4 jam berada dalam lingkungan hipoksia, tikus dikeluarkan dari *hypoxia chamber* dan direoksigenasi di ruangan terbuka dengan konsentrasi oksigen 21% selama 20 jam. Proses induksi hipoksia intermitten kronis dilakukan selama 30 hari dengan durasi 4 jam hipoksia dan 20 jam reoksigenasi.

III. 5.5 Intervensi pemberian *Ficus carica* dan vitamin E

Setelah tikus diinduksi hipoksia intermiten kronis selama 4 jam, tikus diberikan intervensi *puree Ficus carica* secara *force feeding* pada satu jam pertama reoksigenasi, hal ini dilakukan setiap hari selama 30 hari. Dosis yang digunakan disesuaikan dengan kelompok yang telah ditentukan menggunakan randomisasi dengan volume yang diberikan disamakan menjadi 5 mL pada setiap tikus yang diberikan intervensi *puree Ficus carica* dan Vitamin E. sediaan PFC dikeluarkan ke suhu ruang 1 jam sebelum *force feeding*. Kelompok yang tidak diberi intervensi diberi air dengan dosis yang sama (5mL).

III.5.6. Pengumpulan sampel darah

Sampel darah hewan coba akan di ambil *pre-posttest* 30 hari intervensi. Darah akan diambil melalui vena retro orbital sebanyak 0,5 mL yang akan

ditampung dalam tabung EDTA dan disimpan didalam coolbox sebelum dibawa ke lab untuk dianalisis. Sebelum darah di ambil, tikus dianastesi terlebih dahulu menggunakan ketamin dengan dosis 100 mg/KgBB secara intramuskular. Pemantauan yang dilakukan untuk memastikan bahwa tikus sudah teranastesi dengan baik yaitu ketika tikus sudah tidak memberikan respon motorik ketika diberikan ransangan nyeri.

III.5.7. Terminasi dan pengambilan sampel organ

Setelah tikus diberi perlakuan selama 30 hari, tikus akan di terminasi dengan diawali anastesi terlebih dahulu menggunakan ketamin, selanjutnya dilakukan dekapitasi yang dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Departemen Fisiologi FK-KMK. Setelah dilakukan terminasi, jaringan paru akan diambil dan dicuci menggunakan cairan PBS dan dimasukkan kedalam tabung *Eppendorf* lalu disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu -80°C sebelum dilakukan pemeriksaan ELISA. Bangkai tikus di bungkus dan disimpan didalam lemari pendingin bersuhu -18°C sebelum kemudian diinsenerasi dengan alat insenerator Universitas Gadjah Mada.

III.5.8. Pemeriksaan Platelet dan Limfosit pada Darah

Platelet dan limfosit akan diperiksa *pre* dan *post* intervensi dengan menganalisis darah tikus menggunakan alat *hematology analyzer*. Prinsip kerja *hematology analyzer* adalah sampel darah yang sudah dicampur dengan reagen dilusi sebanyak 200x proses *hemolyzing* yang kemudian sampel akan diproses pada blok data *processing* dan hasilnya akan ditampilkan pada monitor dan dicetak.

III.5.9. Pemeriksaan TNF- α homogenat

Kadar TNF-alfa akan diperiksa pada *post* intervensi dengan menganalisis homogenat paru tikus sesuai dengan protokol yang terdapat pada *EliKine™ Rat TNF- α ELISA Kit* No. KTE9007.

Jaringan paru yang telah diambil kemudian dicuci menggunakan *buffer* PBS lalu ditimbang dan dihomogenkan menggunakan PBS. Selanjutnya dilakukan proses sonifikasi untuk menghancurkan sel menggunakan *ultrasonic cell disrupter* atau *suspense* dibuat mengalami siklus beku-cair. Lalu homogenat disentrifugasi selama 5 menit pada 5000xg untuk mendapatkan supernatant.

Persiapan sampel diperlukan sebelum melakukan analisa sampel, persiapan reagen dan komponen lain yang digunakan yaitu:

1. Pengencer Sampel: Pengencer Sampel (5 \times) diencerkan menggunakan air deionisasi 1:5 pada suhu ruang untuk mendapatkan pengencer sampel 1x sebelum digunakan. Aduk perlahan agar tidak berbusa. Simpan pada suhu 4°C. Larutan ini stabil selama 30 hari. 1x *Sample Diluent* digunakan untuk pengenceran sampel standar, serum dan plasma.
2. *Buffer* Pengujian: Penyangga Pengujian (5 \times) diencerkan menggunakan air deionisasi 1:5 pada suhu ruang untuk mendapatkan pengencer sampel 1x sebelum digunakan. Aduk perlahan agar tidak berbusa. Simpan pada suhu 4°C. Larutan ini stabil selama 30 hari. Jika sampel Anda perlu diencerkan. 1x *Assay Buffer* digunakan untuk pengenceran Rat TNF- α *Detect Antibody* (100 \times) dan *Streptavidin-HRP* (100 \times).

3. Standar TNF- α Tikus: Rekonstitusi Standar TNF- α Tikus dalam 1 mL Pengencer 1×Sampel untuk konsentrasi 2.000 pg/mL. Biarkan standar selama minimal 15 menit dengan goyangan lembut sebelum membuat pengenceran. 1× Antibodi Deteksi TNF- α Tikus: Aduk rata sebelum membuat pengenceran. Buat pengenceran 1:100 dari larutan antibodi pendeteksi pekat dengan 1×Assay Buffer dalam tabung plastik bersih sesuai kebutuhan sesuai dengan standar dan sampel. 1×Antibodi Deteksi TNF- α Tikus harus digunakan dalam waktu 30 menit.
4. Streptavidin-HRP: Aduk rata sebelum membuat pengenceran. Buat pengenceran Streptavidin-HRP pekat 1:100 dengan 1× Assay Buffer dalam tabung plastik bersih sesuai kebutuhan sesuai dengan standar dan sampel. 1×Streptavidin-HRP harus digunakan dalam waktu 30 menit.
5. Substrat HRP (TMB): Siap digunakan sesuai persediaan. Seimbangkan dengan suhu kamar sebelum digunakan. Simpan pada suhu 4°C, terlindung dari cahaya.
6. *Solusi Solution*: Siap digunakan sesuai persediaan. Seimbangkan dengan suhu kamar sebelum digunakan. Simpan pada suhu 4°C.
7. *Wash Buffer*: *Wash Buffer* (20×) seimbang dengan suhu kamar dan encerkan dengan air deionisasi 1:20 untuk mendapatkan 1×*Wash Buffer* sebelum digunakan. Aduk perlahan agar tidak berbusa. Simpan pada suhu kamar. Harap diperhatikan bahwa 1×*Wash Buffer* stabil selama 30 hari.
8. Pengaturan kurva standar: Encerkan 2.000 pg/mL standar dengan 1×*Sample Diluent* ke 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 0 pg/mL standar Rat

TNF- α seperti di bawah ini. Prosedur pengujian SOD pada homogenat paru akan dilakukan sebagai berikut:

- a. Keluarkan strip pelat mikro berlebih dari bingkai pelat, kembalikan ke kantong foil yang berisi paket pengering, dan tutup kembali. Strip yang digunakan untuk pengujian diseimbangkan dengan suhu kamar sebelum digunakan.
- b. Tambahkan 100 μ L larutan standar atau sampel per lubang. Direkomendasikan agar semua Standar dan Sampel ditambahkan dalam rangkap dua lempeng mikro. Tutup dengan penutup piring yang disediakan. Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang.
- c. Buang cairan di setiap sumur dan cuci, ulangi proses tersebut hingga total tiga kali pencucian. Cuci dengan mengisi masing-masing sumur dengan 1 \times Wash Buffer (250 μ L) menggunakan pipet multi saluran atau pencuci piring mikro otomatis, dan diamkan selama 1-2 menit, penghilangan cairan secara menyeluruh pada setiap langkah sangat penting untuk kinerja yang baik. Setelah pencucian terakhir, singkirkan sisa 1 \times Wash Buffer dengan membalik piring dan bersihkan dengan tisu yang bersih.
- d. Tambahkan 100 μ L 1 \times Rat TNF- α Detect Antibody ke masing-masing lubang. Tutup dengan penutup piring yang disediakan. Inkubasi selama 1 jam suhu ruang.
- e. Ulangi pencucian seperti pada langkah c.

- f. Tambahkan 100 μ L 1 \times Streptavidin-HRP ke setiap lubang. Tutup piring dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Hindari menempatkan *plate* di bawah cahaya langsung.
- g. Ulangi proses pencucian sebanyak lima kali seperti pada langkah c.
- h. Tambahkan 100 μ L Substrat HRP (TMB) ke masing-masing sumur. Tutup *plate* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Lindungi dari lampu.
- i. Tambahkan 50 μ L *Stop solution* ke masing-masing sumur. *Stop Solution* harus ditambahkan ke *plate* dengan urutan yang sama seperti TMB. Warna disumur harus berubah dari biru menjadi kuning. Jika warna dalam lubang berwarna hijau atau jika perubahan warna tidak tampak seragam, ketuk perlahan *plate* untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
- j. Tentukan densitas optik masing-masing sumur dalam waktu 30 menit, menggunakan pembaca pelat mikro yang diatur ke 450 nm.

III.5.10. Pemeriksaan MDA homogenat

Kadar *Malondialdehyde* (MDA) diperiksa pada *post* intervensi dengan menganalisis homogenat paru tikus sesuai dengan protokol yang terdapat pada *ELISA Kit FineTest® No. EU2577*. Jaringan paru yang diambil dan dicuci menggunakan *buffer* PBS kemudian di timbang lalu dihomogenkan. Proses penghomogenan lebih lanjut menggunakan proses sonikasi pada suspensi dengan menggunakan *ultrasonic cell disrupter* atau dengan membuat suspensi mengalami siklus beku-cair. Homogenat kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada 5000 xg untuk memperoleh supernatan.

Persiapan sampel diperlukan sebelum melakukan analisa sampel, persiapan reagen dan komponen lain yang digunakan yaitu:

1. Sampel dan reagen diencerkan terlebih dahulu lalu dicampur secara merata.
2. Substrat TMB diseimbangkan pada suhu 37°C selama 30 menit sebelum dimasukkan kedalam *wells plate*.
3. Setiap tes yang akan dilakukan, direkomendasikan untuk membuat plot kurva standar.
4. Standar, sampel uji, *well* kontrol (kosong) ditetapkan masing-masing pada *pre-coated plate* dan kemudian catat posisinya sebanyak dua rangkap.
5. *Plate* di cuci sebanyak dua kali sebelum ditambahkan sampel standar dan *well control*.

Prosedur pengujian MDA pada homogenat paru akan dilakukan sebagai berikut:

- a. Sampel dan antibody yang berlabel Biotin: 50ul standar, kontrol atau sampel per well ditambahkan. *Well control* ditambahkan sampel atau *standard dilution buffer*. Kemudian ditambahkan 50ul standar antibody berlabel Biotin *working solution* pada setiap *well* dan segera ditutup dengan *plate sealer*. *Plate* di ketuk dengan lembut untuk memastikan pencampuran. Lalu inkubasi selama 45 menit dengan suhu 37°C.
- b. Setelah inkubasi, dilanjutkan dengan proses pencucian. Pencucian dilakukan dengan cara melepaskan *plate* lalu mencuci *plate* menggunakan *wash buffer* sebanyak 3 kali. *Wash buffer* dibiarkan tetap berada pada *well* setiap satu menit, hal ini dilakukan tiap kali pencucian. Setelah pencucian terakhir, *wash buffer* yang tersisa dibuang dengan aspirasi atau dekantasi.

- c. Tambahkan 100ul *HRP-streptavidin Conjugate* (SABC) *working solution* ke dalam masing-masing *well* kemudian tutup dengan *plate sealer* dan inkubasi pada suhu 37°C. selama 30 menit.
- d. Setelah inkubasi, lakukan pencucian sebanyak 5 kali menggunakan *wash buffer* dan diamkan *wash buffer* selama 1-2 menit setiap kali pencucian.
- e. Setelah pencucian, tambahkan 90ul substrat TMB pada setiap *well*, tutup *plate* dan inkubasi dalam keadaan gelap dengan suhu 37°C selama 10-20 menit.
- f. Tambahkan *stop solution* sebanyak 50ul pada setiap *well* dan warnanya akan menjadi kuning. Penambahan *stop solution* dilakukan bersamaan dengan penambahan TMB *substrat solution*.
- g. Pembacaan OD absorbansi dilakukan segera setelah penambahan *stop solution* pada 450 nm di *microplate reader*.

III.5.11. Pemeriksaan SOD homogenat

Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) akan diperiksa pada *post* intervensi dengan menganalisis homogenat paru tikus sesuai dengan protokol yang terdapat pada *ELISA Kit FineTest®* No. ER1950.

Jaringan paru yang telah diambil kemusian dicuci menggunakan buffer PBS lalu ditimbang dan dihomogenkan menggunakan PBS. Proses selanjutnya akan dilakukan sonifikasi untuk menghancurkan sel menggunakan *ultrasonic cell disrupter* atau suspensi dibuat mengalami siklus beku-cair. Lalu homogenat disentrifugasi selama 5 menit pada 5000xg untuk mendapatkan supernatant.

Persiapan sampel diperlukan sebelum melakukan analisa sampel, persiapan reagen dan komponen lain yang digunakan yaitu:

1. Sampel dan reagen diencerkan terlebih dahulu lalu dicampur secara merata.
2. Substrat TMB diseimbangkan pada suhu 37°C selama 30 menit sebelum dimasukkan kedalam *wells plate*.
3. Setiap tes yang akan dilakukan, direkomendasikan untuk membuat plot kurva standar.
4. Untuk menetapkan standar, sampel uji (diencerkan setidaknya $\frac{1}{2}$ dengan sample dilution buffer), *well* kontrol (kosong) masing-masing pada *pre-coated plate* dan kemudian catat posisinya sebanyak dua rangkap.
5. *Plate* di cuci sebanyak dua kali sebelum ditambahkan sampel standar dan *well control*. Prosedur pengujian SOD pada homogenate paru akan dilakukan sebagai berikut:
 - a. Standar yang dipersiapkan: aliquot 100ul dari *zero tube*, tube pertama, kedua, ketiga, keempat, kelima, keenam dan *sample dilution buffer (blank)* ke dalam *well* standar.
 - b. 100ul sampel yang telah diencerkan dengan benar ditambahkan ke dalam *well* sampel uji.
 - c. *Plate* kemudian ditutup dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
 - d. Lakukan proses pencucian sebanyak 2 kali menggunakan *wash buffer* dengan catatan setiap kali pencucian *well* tidak boleh dibiarkan benar-benar kering.
 - e. Tambahkan 100ul *Biotin-labeled antibody working solution* ke bagian atas dari *well* (standar, sampel uji dan *well* kosong). Kemudian tambahkan larutan

- pada bagian bawah setiap *well* tanpa menyentuh dinding samping dan tutup *plate* untuk dilakukannya inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
- f. Lakukan kembali proses pencucian sebanyak 3 kali menggunakan *wash buffer* dengan membiarkan *wash buffer* berada didalam *well* selama 1-2 menit pada setiap pencucian.
 - g. Tambahkan 100ul *HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) working solution* pada setiap *well* kemudian tutup *plate* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
 - h. Lakukan pencucian kembali sebanyak 5 kali dengan *wash buffer* dan biarkan *wash buffer* pada *well* selama 1-2 menit setiap kali pencucian.
 - i. Tambahkan 90ul substrat TMB pada setiap *well*, kemudian tutup *plate* dan inkubasi dalam gelap selama 10-20 menit dengan suhu 37°C.
 - j. Tambahkan 50ul *stop solution* pada setiap *well* dan akan terjadi perubahan warna secara langsung menjadi warna kuning. Proses penambahan *stop solution* ini dilakukan bersamaan dengan penambahan TMB *substrate solution*.
 - k. Pembacaan OD absorbansi dilakukan segera setelah penambahan *stop solution* pada 450nm di *microplate reader*.

III.5.12. Analisis Hasil

Seluruh data parameter akan dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Saphiro-wilk* dan uji homogenitas menggunakan *levane test* dengan nilai signifikansi $p > 0,05$. Apabila data yang diperoleh menunjukkan hasil terdistribusi normal dan homogen maka

akan dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan *one way* ANOVA dan *repeated measures* ANOVA dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ dan *confident interval* 95%.

Data hasil pengukuran *Malondialdehyde* (MDA), *Superoxide Dismutase* (SOD) dan $\text{TNF-}\alpha$ homogenat jaringan paru yang terdistribusi normal dan homogen akan dilanjutkan dengan uji analisis *one way* ANOVA dan uji *post hoc duncan*. Hasil pengukuran hematologi lengkap (rasio platelet limfosit) di analisis menggunakan uji *repeated measures* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc duncan* untuk menganalisis perbandingan antarkelompok tikus, untuk melihat perubahan kadar PLR antara pre dan post test menggunakan *Paired T-test*. Data ini dianalisis menggunakan program SPSS versi 22.0 untuk software.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1. Hasil Penelitian

IV.1.1. Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan berusia 12 minggu dengan berat badan rerata 224,50 gram pada awal penelitian. *Hypoxia chamber* selama induksi HIK terpantau memiliki kelembapan berkisar antara 70-74%, suhu 26-28⁰C, kadar O₂ 10%. *Clinical heart scoring* yang dipantau selama induksi HIK menunjukkan rerata nilai poin 2 sehingga tidak ada tikus yang di *drop out* selama penelitian ini. Rerata berat badan tikus pada hari terakhir penelitian adalah 231,62 gram.

IV.1.2. Stres Oksidatif dan Antioksidan Pada Paru

IV.1.2.1. Kadar MDA Homogenat Paru

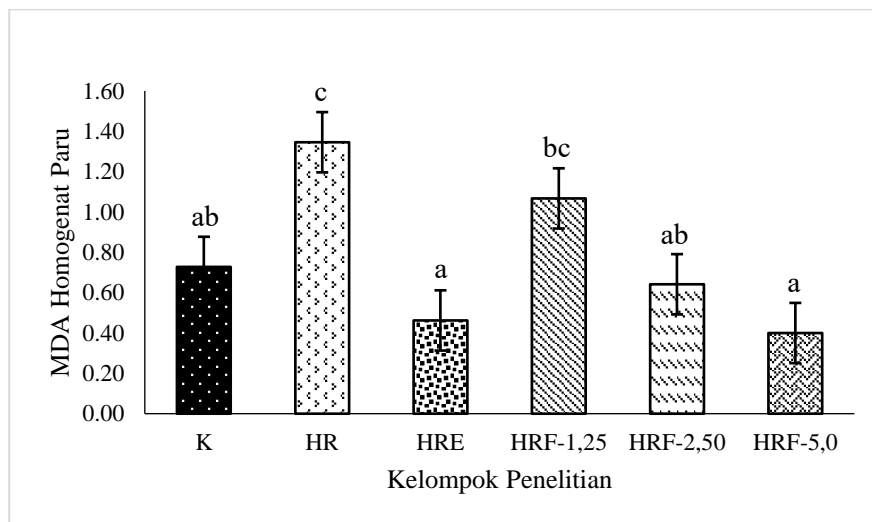
Data rerata MDA homogenat paru diuji dengan *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan sebaran data normal. Uji homogenitas *Levene* pada seluruh kelompok menunjukkan data homogen.

Nilai *malondialdehyde* (MDA) homogenat paru adalah penanda stres oksidatif. Nilai rerata MDA antarkelompok pada tabel 3 menunjukkan angka tertinggi pada kelompok HR yaitu tikus yang diinduksi HIK dan tidak mendapatkan intervensi PFC. Sedangkan nilai rerata paling rendah ditunjukkan pada kelompok HRF-5,0.

Tabel 3. Data rerata kadar MDA jaringan paru antarkelompok penelitian

Kelompok	Mean \pm SD (ng/mL)
K	0,72 \pm 0,28
HR	1,34 \pm 0,55
HR-Vit E	0,46 \pm 0,10
HR-1,25	1,06 \pm 0,12
HR-2,5	0,64 \pm 0,32
HR-5,0	0,39 \pm 0,19
<i>p-value</i> *	0,002*

**p-value* signifikan antarkelompok berdasarkan uji *One-Way ANOVA*



Gambar 11. Perbandingan rerata kadar MDA homogenat paru antarkelompok

Keterangan: kelompok penelitian dengan huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya kelompok dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Pengaruh perlakuan antarkelompok diketahui dari pengujian rerata kadar MDA homogenat paru seluruh kelompok menggunakan uji *one way ANOVA*. Hasilnya menunjukkan adanya perbedaan rerata yang signifikan antarkelompok penelitian dengan *p-value* sebesar 0,002. Kemudian di lanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan rerata antarkelompok.

Kelompok K adalah kelompok yang mewakili kondisi normal menunjukkan rerata kadar MDA yang lebih rendah dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa HIK berhasil memunculkan kondisi stres oksidatif. Rerata kadar MDA pada HRF 2,50 dan HRF-5,0 lebih rendah

dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), namun rerata kadar MDA pada HRF-1,25 tidak berbeda dengan kelompok HR.

Kelompok HRE, yaitu kontrol positif yang diberikan intervensi vitamin E menunjukkan rerata kadar MDA yang lebih rendah dibandingkan kelompok HRF-1,25 ($p < 0,05$), sementara rerata kadar MDA kelompok HRF-5,0 lebih rendah dibandingkan HRF-1,25 ($p < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa kelompok HRF-5,0 memiliki kemampuan menyerupai kelompok HRE dalam menekan kadar MDA.

IV.1.2.2. Kadar SOD Homogenat paru

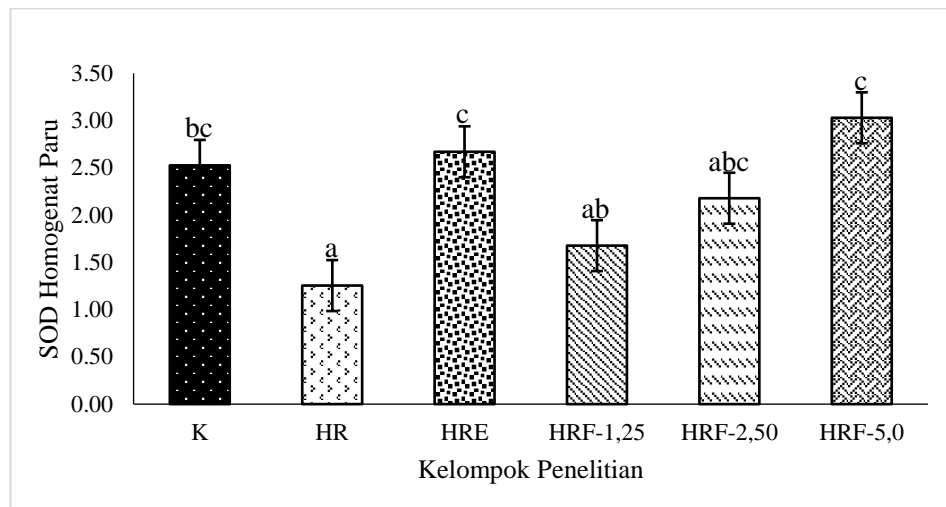
Sebaran data kadar SOD homogenat paru pada penelitian ini diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan sebaran data normal. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene* menunjukkan sebaran data homogen.

Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) homogenat paru adalah penanda antioksidan. Nilai rerata SOD antarkelompok pada tabel 4 menunjukkan angka tertinggi pada kelompok HRF-5,0 yaitu kelompok yang diinduksi HIK dengan pemberian intervensi PFC. Sedangkan nilai rerata paling rendah ditunjukkan pada kelompok HR yaitu kelompok yang diinduksi HIK tanpa diberi intervensi.

Tabel 4. Data rerata kadar SOD homogenat paru antarkelompok penelitian

Kelompok	Mean \pm SD (ng/mL)
K	2,52 \pm 0,46
HR	1,25 \pm 0,10
HR-Vit E	2,66 \pm 0,37
HRF-1,25	1,67 \pm 0,66
HRF-2,5	2,17 \pm 0,54
HRF-5,0	3,02 \pm 1,04
<i>p-value</i> *	0,006*

* *p-value* antarkelompok berdasarkan uji *one way ANOVA*



Gambar 12. Perbandingan rerata kadar SOD homogenat paru antarkelompok penelitian

Keterangan: kelompok penelitian dengan huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya kelompok dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Pengaruh perlakuan antarkelompok diketahui dari pengujian rerata kadar SOD homogenat paru seluruh kelompok menggunakan uji *one way* ANOVA. Hasilnya menunjukkan adanya perbedaan rerata yang signifikan antarkelompok penelitian dengan *p-value* sebesar 0,006. Kemudian di lanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan rerata antarkelompok.

Pada penelitian ini, kelompok K yang merupakan kelompok kontrol netral mewakili kondisi normal memiliki kadar SOD lebih tinggi dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa HIK berhasil memunculkan stres oksidatif yang mengakibatkan kadar SOD lebih rendah pada kelompok HR dibandingkan kelompok K. Rerata kadar SOD pada kelompok HRF-5,0 lebih tinggi dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), namun rerata kadar SOD pada kelompok HRF-1,25 dan HRF-2,50 tidak berbeda dengan kelompok HR.

Kelompok HRE, yaitu kelompok kontrol positif yang diberikan antioksidan berupa vitamin E, menunjukkan rerata kadar SOD yang lebih tinggi dibandingkan kelompok HRF-1,25 ($p < 0,05$), sementara rerata kadar SOD HRF-5,0 lebih tinggi dibandingkan kelompok HRF-1,25 ($p < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa HRF-5,0 memiliki kemampuan menyerupai HRE dalam menekan stres oksidatif.

IV.1.2.3. Kadar Rasio SOD/MDA Paru

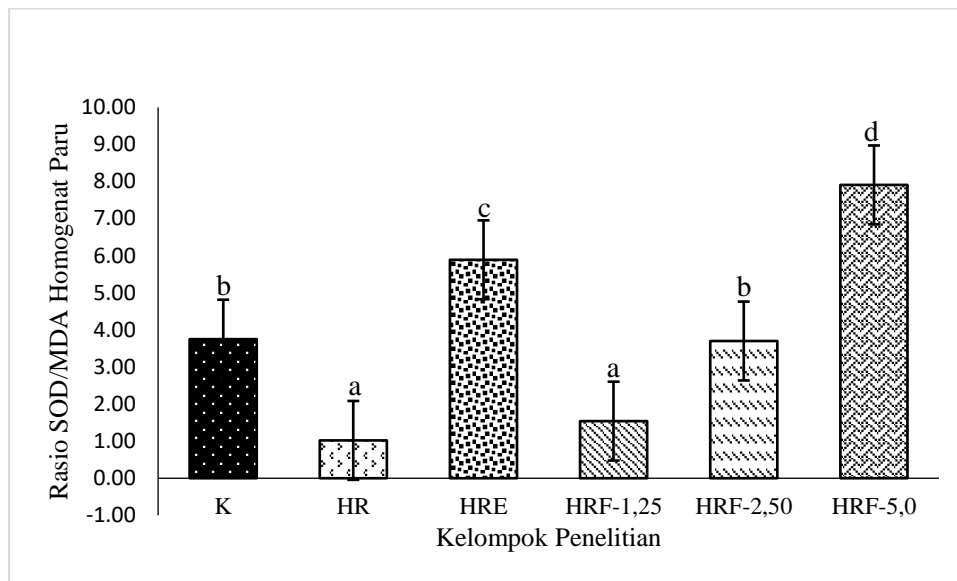
Sebaran data kadar rasio SOD/MDA pada seluruh kelompok penelitian di uji menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang menunjukkan sebaran data normal. Uji homogenitas data kadar SOD/MDA menggunakan uji *Levene* yang menunjukkan data homogen.

Rasio SOD terhadap MDA digunakan untuk menunjukkan tingkat kerusakan sel akibat radikal bebas oksigen dan kapasitas antioksidannya. Nilai rerata rasio SOD/MDA antarkelompok pada tabel 5 menunjukkan angka tertinggi pada kelompok HRF-5,0 yaitu kelompok yang diinduksi HIK dengan pemberian intervensi PFC. Sedangkan nilai rerata paling rendah ditunjukkan pada kelompok HR yaitu kelompok yang diinduksi HIK tanpa diberi intervensi.

Tabel 5. Data rerata rasio SOD/MDA homogenat paru antarkelompok penelitian

Kelompok	Mean \pm SD (ng/mL)
K	3,75 \pm 1,06
HR	1,02 \pm 0,30
HR-Vit E	5,89 \pm 0,85
HRF-1,25	1,54 \pm 0,48
HRF-2,5	3,70 \pm 0,82
HRF-5,0	7,91 \pm 1,11
<i>p-value</i> *	0,000*

* *p-value* antarkelompok berdasarkan uji *one way ANOVA*



Gambar 13. Perbandingan rerata kadar SOD/MDA homogenat paru antarkelompok penelitian

Keterangan: kelompok penelitian dengan huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya kelompok dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Pengaruh perlakuan antarkelompok diketahui dari pengujian rerata kadar SOD/MDA seluruh kelompok penelitian menggunakan *one way* ANOVA. Hasilnya menunjukkan adanya perbedaan rerata yang signifikan antarkelompok penelitian dengan *p-value* sebesar 0,000. Kemudian di lanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan rerata antarkelompok.

Kelompok K, yaitu kelompok yang mewakili kondisi normal, rerata kadar rasio SOD/MDA lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok HR ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan bahwa HIK berhasil memunculkan stres oksidatif. Rerata kadar SOD/MDA pada kelompok HRF-2,50 dan HRF-5,0 memiliki rerata kadar SOD/MDA yang lebih tinggi dibandingkan HR ($p < 0,05$), namun kadar rerata rasio SOD/MDA pada HR tidak berbeda dengan kelompok HRF-1,25.

Kelompok HRE, yaitu kontrol positif dengan pemberian antioksidan dari vitamin E, menunjukkan rerata kadar rasio SOD/MDA lebih tinggi dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), sementara rerata kadar rasio SOD/MDA kelompok HRF-5,0 lebih tinggi dibandingkan kelompok HRF-1,25, HRF-2,50 dan HRE. Hal ini mengindikasikan bahwa kelompok HRF-5,0 memiliki kemampuan menyerupai atau bahkan bisa lebih baik dibandingkan HRE dalam mencegah stres oksidatif.

IV.1.3 Inflamasi Paru

IV.1.3.1 Kadar *Platelet Lymphocyte Ratio* (PLR)

Sebaran data rerata kakadar PLR seluruh kelompok *pre-test* dan *post-test* di uji menggunakan *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan sebaran data normal. Uji homogenitas rerata kadar plateler, limfosit dan PLR seluruh kelompok diuji menggunakan *Levene* dan menunjukkan sebaran data homogen.

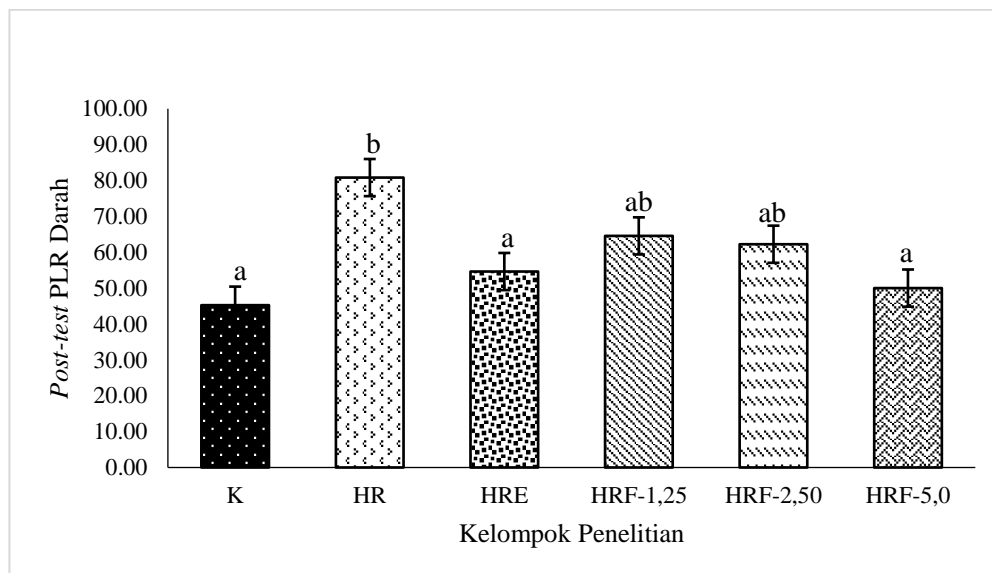
Nilai rerata kadar PLR antarkelompok pada tabel 6 pada *post-test* setelah diberi intervensi PFC, menunjukkan nilai rerata tertinggi pada kelompok HR yaitu kelompok yang diinduksi HIK tanpa pemberian intervensi PFC. Sedangkan nilai rerata paling rendah ditunjukkan pada kelompok HRF-5,0 yaitu kelompok yang diinduksi HIK dengan diberi intervensi PFC.

Tabel 6. Data rerata kadar PLR (*Platelet Lymphocyte Ratio*) darah antarkelompok penelitian

Kelompok	Mean±SD ($10^3/\mu\text{L}$)		<i>p-value</i> **
	Pre	Post	
K	59,23±12,47	45,24±11,21	0,076
HR	64,21±27,17	80,82±24,54	0,171
HRE	57,07±26,24	54,62±12,21	0,754
HRF-1,25	60,73±5,98	64,55±6,42	0,278
HRF-2,50	60,83±5,72	62,23±12,94	0,862
HRF-5,0	50,45±3,68	50,01±17,31	0,969
<i>p-value</i> *	0,896	0,049*	

**p-value* antarkelompok berdasarkan uji *one way* ANOVA

** *p-value* beda rerata *pre-post test* kelompok berdasarkan uji *Paired T*



Gambar 14. Perbandingan rerata kadar PLR *post-test* kelompok penelitian

Keterangan: kelompok penelitian dengan huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya kelompok dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Perbedaan pengaruh pemberian intervensi antara *pre-post test* pada kelompok penelitian yang diinduksi HIK diuji menggunakan *Paired T*. Hasil uji menunjukkan jika rerata kadar PLR *pre-post test* tidak menunjukkan perbedaan. Pengaruh perlakuan antarkelompok penelitian diketahui dari uji *one way* ANOVA. Hasilnya menunjukkan perbedaan rerata antarkelompok penelitian pada *post-test*

dengan *p-value* sebesar 0,049. Kemudian di lanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan rerata antarkelompok.

Kelompok K mewakili kondisi normal, memiliki rerata kadar PLR lebih rendah dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa kondisi HIK berhasil memunculkan inflamasi sistemik. Rerata kadar PLR pada kelompok HRF-5,0 lebih rendah dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), namun kelompok HRF-1,25 dan kelompok HRF-2,50 tidak berbeda dengan kelompok HR.

Kelompok HRE, yaitu kontrol negatif yang diberikan antioksidan vitamin E menunjukkan kadar PLR yang lebih rendah dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), sementara rerata kadar PLR pada kelompok HRF-1,25, HRF-2,50, dan HRF-5,0 menunjukkan tidak ada perbedaan antar kelompok.

IV.1.3.2 Kadar *Tumor Factor Necrosis* - α (TNF- α) homogenat paru

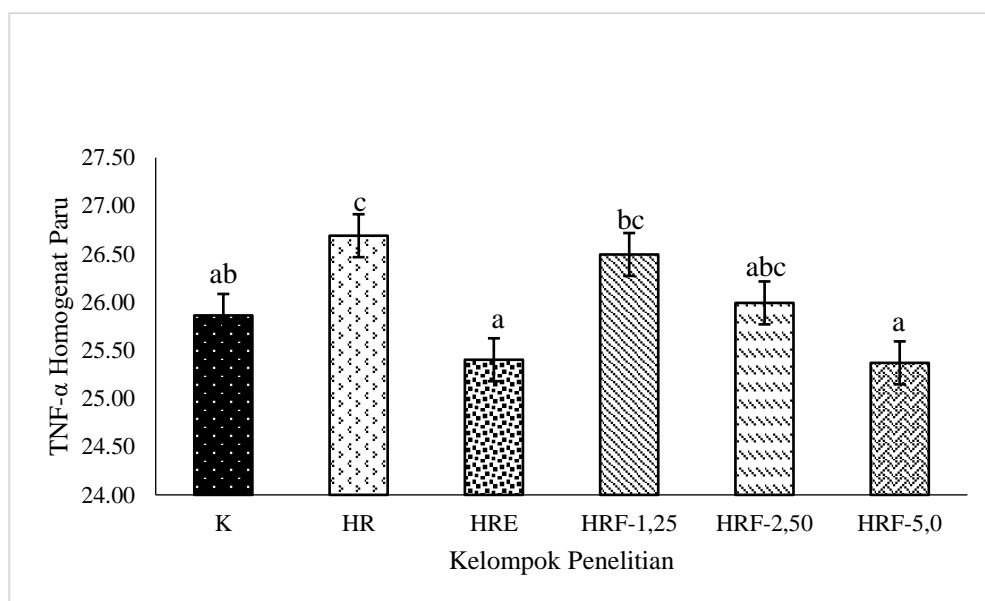
Sebaran data rerata kadar TNF- α homogenat pada seluruh kelompok penelitian di uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan sebaran data normal. Uji Homogenitas data rerata kadar TNF- α homogenat paru pada seluruh kelompok penelitian menggunakan *Levene* dan menunjukkan data homogen.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) adalah salah satu penanda inflamasi jaringan paru. Nilai rerata kadar TNF- α antarkelompok pada tabel 7 menunjukkan angka tertinggi pada kelompok HR yaitu kelompok yang diinduksi HIK tanpa diberi intervensi PFC. Sedangkan nilai rerata paling rendah ditunjukkan oleh kelompok HRF-5,0, yaitu kelompok yang diinduksi HIK dengan pemberian intervensi PFC.

Tabel 7. Data rerata kadar TNF- α homogenat paru antarkelompok penelitian

Kelompok	Mean \pm SD (ng/mL)
K	25,86 \pm 0,572
HR	26,69 \pm 0,434
HR-Vit E	25,40 \pm 0,433
HR-1,25	26,49 \pm 0,434
HR-2,5	25,99 \pm 0,246
HR-5,0	25,37 \pm 0,561
<i>p-value</i> *	0,003*

* *p-value* antarkelompok berdasarkan uji *one way ANOVA*



Gambar 15. Perbandingan rerata kadar TNF- α homogenat paru antarkelompok penelitian

Keterangan: kelompok penelitian dengan huruf yang sama pada grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan, sebaliknya kelompok dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Pengaruh perlakuan antarkelompok diketahui dari pengujian rerata kadar TNF- α homogenat paru seluruh kelompok penelitian menggunakan *one way ANOVA*. Hasilnya menunjukkan adanya perbedaan rerata yang signifikan antarkelompok penelitian dengan *p-value* sebesar 0,003. Kemudian di lanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan* untuk melihat perbedaan rerata antarkelompok.

Kelompok K mewakili kondisi normal memiliki rerata kadar TNF- α lebih rendah dibandingkan kelompok HR yang merupakan kontrol negatif ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa HIK berhasil memunculkan inflamasi pada jaringan paru. Rerata kadar TNF- α pada kelompok HRF-5,0 memiliki nilai lebih rendah dibandingkan kelompok HR ($p < 0,05$), namun rerata kadar TNF- α pada HR tidak menunjukkan perbedaan dengan kelompok HRF-1,25 dan kelompok HRF-2,50.

Kelompok HRE, yaitu kelompok kontrol positif yang diberikan antioksidan vitamin E, menunjukkan rerata kadar TNF- α lebih rendah dibandingkan kelompok HRF-1,25 ($p < 0,05$), sementara rerata kadar TNF- α kelompok HRF-5,0 memiliki nilai lebih rendah dibandingkan kelompok HRF-1,25 ($p < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa kelompok HRF-5,0 menyerupai kemampuan HRE dalam menekan inflamasi.

IV.2. Pembahasan

IV.2.1. Stres Oksidatif

Hipoksia intermiten kronis (HIK) merupakan kondisi hipoksia yang terdiri dari siklus normoksia dan hipoksia yang terjadi secara berulang, kondisi ini mengaktivasi HIF-1 α yang dapat menyebabkan stres oksidatif (Song *et al.*, 2017). Stres oksidatif merupakan kondisi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan antioksidannya, ROS yang meningkat menyebabkan peroksidasi lipid yang dapat dilihat melalui nilai MDA.

Pada penelitian ini, kelompok K yang mewakili kondisi normal memiliki rerata kadar MDA lebih rendah dibandingkan kelompok HR (kontrol negatif) yang

diinduksi hipoksia tanpa intervensi PFC. Tingginya rerata kadar MDA homogenat paru pada kelompok HR menandakan bahwa HIK dapat menyebabkan stres oksidatif yang mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga meningkatkan produksi MDA yang merupakan produk hasil peroksidasi lipid tersebut. Mekanisme peroksidasi lipid merupakan proses yang bergantung pada radikal dengan relevansi fisiologis yang menghasilkan pembentukan berbagai macam produk oksidasi, yang paling umum adalah aldehida. Diantara aldehida yang paling banyak diproduksi adalah *malondialdehyde* (MDA) (Valko *et al.*, 2016). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Zhang *et al.*, 2018) yang menyatakan bahwa peningkatan MDA menandakan adanya peningkatan dari stres oksidatif.

Peningkatan stres oksidatif akibat dari produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan oksidasi dan kerusakan, serta menyebabkan peningkatan respon peradangan dan pada gilirannya, peradangan dapat meningkatkan stres oksidatif (Li *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh (Zhao *et al.*, 2016) menyatakan bahwa MDA yang merupakan produk peroksidasi lipid kadarnya berkorelasi positif dengan derajat kerusakan yang diakibatkan oleh stres oksidatif, kadar MDA meningkat pada saat diinduksi HIK. Stres oksidatif dapat terjadi jika terjadi ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan. Antioksidan disusun oleh serangkaian enzim, salah satunya adalah SOD yang berperan penting dalam menetralkan ROS (Valko *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, kelompok HRE yang merupakan kontrol positif dengan pemberian antioksidan vitamin E memiliki rerata kadar MDA homogenat paru lebih rendah dibandingkan kelompok HR sebagai kelompok negatif, begitupun dengan

kelompok intervensi HRF-5,0 juga memiliki rerata kadar MDA homogenat paru yang lebih rendah dibandingkan kelompok HR, namun kelompok HRF-1,25 dan HRF-2,50 tidak menunjukkan perbedaan rerata dengan kelompok HR. Menurut (Laouafa *et al.*, 2020) HIK meningkatkan produksi ROS dan menurunkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD. Hal inilah yang menyebabkan rerata kadar MDA pada kontrol negatif yaitu HR lebih tinggi dibandingkan kelompok HRE dan kelompok intervensi.

Pada stres oksidatif, oksidan yang pertama kali dihasilkan adalah anion superoksida dan pertahanan alami terhadap superoksida adalah dismutasinya oleh SOD menjadi H_2O_2 dan oksigen (D'Agrosa *et al.*, 2021). Dalam kondisi fisiologis, terdapat keseimbangan antara pembentukan ROS dan eliminasinya oleh sistem antioksidan terutama oleh *superoxyde dismutase* (SOD) (Coimbra-Costa *et al.*, 2017), oleh sebab itulah penelitian ini menggunakan SOD sebagai penanda antioksidan endogen. Pada penelitian ini, rerata kadar SOD homogenat paru pada kelompok K yang merupakan kelompok kontrol netral dan mewakili kondisi normal memiliki kadar SOD homogenat paru yang lebih tinggi dibandingkan kelompok HR yang merupakan kelompok kontrol negatif yang diinduksi HIK tanpa pemberian intervensi, hal ini menandakan bahwa pada kelompok HR, kondisi HIK menyebabkan antioksidan endogen berkurang. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, 2017) yang menunjukkan bahwa kadar SOD semakin menurun seiring dengan meningkatnya stres oksidatif akibat HIK.

Pada penelitian ini kelompok HRE yang merupakan kelompok kontrol positif yang diberi antioksidan vitamin E memiliki rerata kadar SOD homogenat jaringan paru yang lebih tinggi dibandingkan kelompok HR, begitupun dengan kelompok intervensi terutama HRF-5,0 yang memiliki rerata kadar SOD homogenat paru yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan kelompok HR. Namun, kelompok HRF-1,25 dan kelompok HRF-2,50 tidak menunjukkan rerata yang berbeda dengan kelompok HR. Menurut (Wang *et al.*, 2018) yang melakukan penelitian mengenai efek tempol sebagai penekan efek stres oksidatif dan inflamasi pada cedera paru akibat HIK menunjukkan bahwa kadar SOD yang tinggi menyebabkan kadar MDA menurun dan hal ini menekan stres oksidatif. Pada penelitian ini rerata kadar SOD homogenat pada kelompok HRF-5,0 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok HR menunjukkan bahwa pemberian intervensi dengan dosis 5,0 mL/grBB/hari mampu menekan stres oksidatif yang di sebabkan oleh HIK.

Untuk menunjukkan tingkat kerusakan sel yang diakibatkan oleh radikal bebas (ROS) dan kapasitas antioksidannya maka digunakan rasio SOD/MDA (Zhang *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, kemampuan antioksidan dalam mengatasi oksidan yang disebabkan oleh HIK dibuktikan dengan rasio SOD/MDA, pada kelompok K yang mewakili kelompok normal memiliki rerata rasio SOD/MDA lebih tinggi dibandingkan kelompok HR. Rendahnya rasio SOD/MDA pada kelompok HR menunjukkan bahwa kelompok HR tidak memiliki antioksidan yang cukup untuk mengeliminasi oksidan yang diproduksi akibat dari kondisi HIK. Pada kelompok HRE yang merupakan kelompok dengan penambahan antioksidan

vitamin E memiliki rasio SOD/MDA yang lebih tinggi dibandingkan HR, begitupun kelompok intervensi HRF-2,50 dan HRF-5,0 yang memiliki rasio SOD/MDA yang lebih tinggi dibandingkan kelompok HR. Namun pada kelompok HRF-1,25 tidak ditemukan adanya perbedaan dengan kelompok HR, hal ini mungkin karena antioksidan pada kelompok HRF-1,25 masih belum cukup untuk mengeliminasi oksidan akibat HIK meskipun sudah ditambah dengan antioksidan eksogen yang berasal dari PFC.

Pada penelitian ini HIK berhasil menyebabkan stres oksidatif pada paru tikus yang ditunjukkan oleh tingginya kadar MDA homogenat jaringan paru pada kelompok yang diinduksi HIK tanpa pemberian intervensi PFC dibandingkan kelompok kontrol (K dan HRE) dan kelompok intervensi (HRF-5,0). Pemberian intervensi PFC berhasil menekan stres oksidatif dengan dosis terbaik pada 5,0 mL/200grBB/hari yang ditunjukkan oleh tingginya kadar SOD, rasio SOD/MDA dan rendahnya kadar MDA pada kelompok HRF-5,0.

IV.2.2. Inflamasi

Inflamasi merupakan respon dari sistem imun sebagai perlindungan terhadap cedera atau kerusakan jaringan (Hussain *et al.*, 2016). Peningkatan radikal bebas akibat HIK yang menyebabkan stres oksidatif pada paru tikus diketahui mampu menginduksi respon inflamasi di paru yang dapat menyebabkan kerusakan epitel diikuti kerusakan endotel dan kemudian akan mengaktifasi mekanisme perbaikan yang pada akhirnya dapat menyebabkan fibrosis paru (Tuleta *et al.*, 2016).

Stres oksidatif menyebabkan inflamasi dengan meningkatkan ekspresi gen yang mengkode protein inflamasi termasuk NF- κ B yang memicu respon inflamasi sistemik seperti peningkatan PLR, serta produksi kemokin dan sitokin proinflamasi seperti TNF- α (Masood *et al.*, 2017; Kurtul & Ornek, 2019; Kong *et al.*, 2021). *Platelet lymphocyte ratio* (PLR) merupakan indeks yang menggabungkan potensi peradangan trombosit, dengan penurunan limfosit yang merupakan suatu respon stres (Unnikrishnan *et al.*, 2015) dan dihitung dengan membagi jumlah platelet dengan jumlah limfosit (Kurtul & Ornek, 2019).

Rerata kadar PLR *post-test* pada kelompok K yang mewakili kondisi normal memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan kelompok HR yang menunjukkan bahwa kondisi HIK memunculkan kondisi inflamasi. Pembentukan interaksi antara trombosit dengan leukosit terjadi secara teratur pada kondisi sehat dan akan meningkat pada saat terjadi inflamasi. Trombosit dan leukosit dapat saling mengaktivasi satu sama lain, sehingga memungkinkan leukosit mengganggu sistem homeostasis dan trombosit mengganggu sistem kekebalan tubuh karena interaksi trombosit dan leukosit yang saling mengaktivasi dapat menyebabkan peningkatan respon imun (Schrottmaier *et al.*, 2020). Menurut (Günbatır *et al.*, 2015) pada kondisi HIK trombosit yang teraktivasi dapat memicu rekrutmen leukosit ke dinding pembuluh darah dan memulai peradangan.

Rerata kadar PLR *post-test* kelompok HRE lebih rendah dibandingkan kelompok HR yang merupakan kelompok negatif, begitupun rerata kadar PLR *post-test* pada kelompok intervensi HRF-5,0 yang lebih rendah dibandingkan kelompok HR, hal ini menunjukkan bahwa senyawa antiinflamasi yang terdapat pada PFC

dengan dosis 5,0 mL/200grBB/hari mampu menghambat inflamasi akibat HIK. Namun pada kelompok intervensi HRF-1,25 dan HRF-2,50 tidak menunjukkan adanya perbedaan rerata terhadap HR, hal ini mungkin disebabkan oleh kurangnya senyawa yang berperan sebagai antiinflamasi pada PFC dengan dosis 1,25 dan 2,50 gr/200grBB/hari.

Respon inflamasi yang diatur oleh beberapa sitokin proinflamasi memainkan peran penting dalam perkembangan inflamasi paru akibat dari HIK. *Tumor necrosis factor* - α (TNF- α) merupakan salah satu sitokin yang diregulasi pada saat HIK dan memiliki korelasi kuat dengan tingkat keparahan akibat HIK. Peningkatan ROS yang disebabkan oleh efek langsung dari stres oksidatif atau melalui produk peroksidasi lipid yang mengaktifkan NF- κ B dapat meningkatkan kadar sitokin inflamasi TNF- α (Xiao *et al.*, 2019).

Dalam penelitian ini, pernyataan (Xiao *et al.*, 2019) mengenai HIK yang menyebabkan inflamasi ditunjukkan oleh rerata kadar TNF- α pada kelompok HR HR yang merupakan kelompok kontrol negatif yang diinduksi HIK tanpa pemberian intervensi PFC memiliki rerata kadar lebih tinggi dibandingkan kelompok K yang mewakili kondisi normal. Menurut (Wang *et al.*, 2018) TNF- α dapat merangsang ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang juga dapat meningkatkan tingkat NO yang merupakan mediator inflamasi, sehingga produksi TNF- α meningkatkan inflamasi dan memperparah akibat dari HIK.

Rerata kadar TNF- α pada kelompok HRE yang merupakan kelompok dengan antioksidan vitamin E memiliki rerata yang lebih rendah dibandingkan

kelompok HR, begitupun dengan kelompok HRF-5,0 yang merupakan kelompok diinduksi HIK dnegan pemberian intervensi PFC. Namun pada kelompok intervensi HRF-1,25 dan HRF-2,50 tidak menunjukkan adanya perbedaan dengan rerata kadar TNF- α kelompok HR. Rerata kadar TNF- α yang lebih rendah pada kelompok intervensi PFC terutama kelompok HRF-5,0 menandakan bahwa kandungan senyawa bioaktif yang terdapat didalam PFC mampu mencegah dan mengurangi inflamasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Rezagholizadeh *et al.*, 2022) yang menyatakan kandungan senyawa bioaktif pada *F.carica* salah satunya flavonoid berperan sebagai antiinflamasi yang terbukti mampu mengurangi sitokin inflamasi seperti TNF- α dengan menghambat sekresi iNOS.

Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa *F.carica* mengandung alkaloid, tanin, glikosida, flavonoid, saponin, kumarin, fenol, sterol, terpen, karbohidrat, dan protein. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang banyak ditemukan pada buah, daun, dan lateks *F.carica*, dan dalam penyelidikan fitokimia pada buah ini, ditemukan 16 turunan isoflavon terprenilasi diisolasi dan dipastikan memiliki efek anti-inflamasi yang luar biasa karena tindakan penghambatannya terhadap produksi NO. Flavonoid morin, hesperetin, dan rutin terbukti efektif dalam mengurangi sitokin inflamasi IL-1 β , IL-6, dan TNF- α pada hewan penderita diabetes (Ginwala *et al.*, 2019). Quercetin flavonoid terbukti menghambat sekresi iNOS dan TNF- α yang diinduksi LPS oleh bakteri dalam makrofag, sekresi IL-1 β dan TNF- α yang diinduksi LPS. Selanjutnya, quercetin mengurangi TNF- α dan IL-6 pada model tikus (Yi *et al.*, 2017; Rezagholizadeh *et al.*, 2022).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa PFC yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi memiliki potensi dalam menekan stres oksidatif dan inflamasi yang diakibatkan oleh hipoksia intermiten kronis yang dilihat dengan adanya perbedaan rerata pada kadar MDA, SOD, SOD/MDA, PLR dan TNF- α pada kelompok penelitian HRF-5,0 dengan dosis 5,0 mL/200grBB/hari dibanding kelompok kontrol negatif dan kelompok intervensi dengan dosis 1,25 mL/200grBB/hari dan dosis 2,50 mL/200grBB/hari.

IV.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini adalah peneliti belum mengukur kadar CO₂ didalam hypoxia chamber.

BAB V

KESIMPULAN

V.1. Kesimpulan

Penelitian ini membuktikan kemampuan puree *Ficus carica* menekan stres oksidatif dan inflamasi akibat induksi HIK pada paru tikus SD, yang dapat disimpulkan dari temuan berikut:

1. Nilai rerata MDA homogenat paru pada kelompok HRF 5,0 lebih rendah dibandingkan kelompok HR (kontrol negatif).
2. Nilai rerata SOD homogenat paru pada kelompok HRF 5,0 lebih tinggi dibandingkan kelompok HR (kontrol negatif).
3. Rasio SOD/MDA kelompok HRF 5,0 lebih tinggi dibandingkan kelompok HR (kontrol negatif).
4. Rasio PLR kelompok HRF 5,0 lebih rendah dibandingkan HR (kontrol negatif).
5. Rerata nilai TNF- α homogenat paru pada kelompok HR 5,0 lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (HR).

V.2.Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk mengukur kadar CO₂ di dalam *hypoxia chamber* untuk meminimalisasi bias terhadap hasil penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-rahman, R., Ghoneimy, E., Abdel-wahab, A., & Eldeeb, N. (2021). South African Journal of Botany The therapeutic effects of Ficus carica extract as antioxidant and anticancer agent. *South African J. Bot.* 141 : 273–277.
- Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M., & Hassan, F.A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *J. Funct. Foods* 5 : 1542–1553.
- Aprioku, J.S., Aprioku, J.S., & Har-, P. (2013). Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis 14 : 158–172.
- Araneda, O.F., & Tuesta, M. (2012). Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- Aung, H.H., Sivakumar, A., Gholami, S.K., Venkateswaran, S.P., Gorain, B., & Shadab (2019). An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung, Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer. Elsevier Inc.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014.
- Ayuso, M., Carpena, M., Taofiq, O., Simal-gandara, J., Oliveira, M.B.P.P., Prieto, M.A., *et al.* (2022). Trends in Food Science & Technology Fig “ Ficus carica L . ” and its by-products : A decade evidence of their health-promoting benefits towards the development of novel food formulations 127 : 1–13.
- Chen, P.S., Chiu, W.T., Hsu, P.L., Lin, S.C., Peng, I.C., Wang, C.Y., *et al.* (2020). Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J. Biomed. Sci.* 27 : 1–19.
- Coimbra-Costa, D., Alva, N., Duran, M., Carbonell, T., & Rama, R. (2017). Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. *Redox Biol.* 12 : 216–225.
- Corrado, C., & Fontana, S. (2020). Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects. *Int. J. Mol. Sci.* 21 : 5611.
- D’Agrosa, C., Cai, C.L., Siddiqui, F., Deslouches, K., Wadowski, S., Aranda, J. V., *et al.* (2021). Comparison of coenzyme Q10 or fish oil for prevention of intermittent hypoxia-induced oxidative injury in neonatal rat lungs. *Respir. Res.* 22 : 1–11.

- Debevec, T., Millet, G.P., & Pialoux, V. (2017). Hypoxia-induced oxidative stress modulation with physical activity. *Front. Physiol.* 8 : 1–9.
- Dengler, F. (2020). Activation of ampk under hypoxia: Many roads leading to rome. *Int. J. Mol. Sci.* 21 : 1–15.
- Dromant, M., Borr, C., Mas-bargues, C., & Escriv, C. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde . Human plasma reference values in health and disease 709.
- Falistocco, E. (2020). The Millenary History of the Fig Tree (*Ficus carica* L.). *Adv. Agric. Hort. Entomol.* 2020 : 1–8.
- Ganong. (2012). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Jakarta : EGC Medical, 2012. - 24th
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D.G.I., Jain, P., & Khan, Z.K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants* 8 : 1–28.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview, Archives of Toxicology.
- Günbatar, H., Ekin, S., Sünnetçioğlu, A., Arısoy, A., Çilingir, B.M., Aşker, S., *et al.* (2015). The relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Dicle Med. J. / Dicle Tip Derg.* 42 : 289–293.
- Gupta, N., Zhao, Y.Y., & Evans, C.E. (2019). The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb. Res.* 181 : 77–83.
- Guyton, A. C. (2020) Guyton and Hall: Textbook of Medical. Physiology 14th Edition, Elsevier Inc. Philadelphia: Elyse O'Grady.
- Hajam, T.A., & Saleem, H. (2022). Chemico-Biological Interactions Phytochemistry , biological activities , industrial and traditional uses of fig (*Ficus carica*): A review. *Chem. Biol. Interact.* 368 : 110237.
- Helmut Sies, Carsten Berndt, and D.P.J. (2017). Oxidative Stress. Annual Review of Biochemistry, 86(1), 715-748. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037. *Annu. Rev. Biochem.*
- Higgins, M.R., & Izadi, A. (2020). Antioxidants and Exercise Performance : With a Focus on Vitamin E and C Supplementation.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.

- Iturriaga, R., & Castillo-Galán, S. (2019). Potential Contribution of Carotid Body-Induced Sympathetic and Renin-Angiotensin System Overflow to Pulmonary Hypertension in Intermittent Hypoxia. *Curr. Hypertens. Rep.* 21.
- Jov, M., Mota-martorell, N., Pradas, I., Mart, M., Ayala, V., & Pamplona, R. (2020). The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity 1–20.
- Karak, P. (2019). BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS : AN OVERVIEW INTRODUCTION : Polyphenols are chemical 10.
- Kong, Y.R., Jong, Y.X., Balakrishnan, M., Bok, Z.K., Weng, J.K.K., Tay, K.C., *et al.* (2021). Beneficial role of carica papaya extracts and phytochemicals on oxidative stress and related diseases: A mini review. *Biology (Basel)*. 10 : 1–20.
- Kurtul, A., & Ornek, E. (2019). Platelet to Lymphocyte Ratio in Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *Angiology* 70 : 802–818.
- Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwowski, Z., Pajdo, R., & Jagiellonian, P. (2014). Review article Lipid Peroxidation , Reactive Oxygen Species And Antioxidative Factors In The Pathogenesis Of Gastric Mucosal Lesions And Mechanism Of Protection Against Oxidative Stress - Induced Gastric Injury 613–622.
- Labarca, G., Gower, J., Lamperti, L., Dreyse, J., & Jorquera, J. (2020). Chronic intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea: a narrative review from pathophysiological pathways to a precision clinical approach. *Sleep Breath.* 24 : 751–760.
- Laouafa, S., Ribon-Demars, A., Marcouiller, F., Roussel, D., Bairam, A., Pialoux, V., *et al.* (2020). Corrigendum to: Estradiol Protects Against Cardiorespiratory Dysfunctions and Oxidative Stress in Intermittent Hypoxia. *Sleep* 43.
- Lee, J.W., Ko, J., Ju, C., & Eltzschig, H.K. (2019). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* 51 : 1–13.
- Lee, P., Chandel, N.S., & Simon, M.C. (2020). Ulasan Adaptasi seluler terhadap hipoksia melalui faktor- faktor yang diinduksi hipoksia dan seterusnya Ulasan 268–283.
- Lewis, E.D., Meydani, S.N., & Wu, D. (2019). Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life* 71 : 487–494.
- Li, L., Ren, F., Qi, C., Xu, L., Fang, Y., Liang, M., *et al.* (2018). Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis via oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea. *Respir. Res.* 19 : 1–9.

- Lu, W., Kang, J., Hu, K., Tang, S., Zhou, X., Yu, S., *et al.* (2016). Angiotensin-(1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 49 : 1–9.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224 : 164–175.
- Martirosyan, D.M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? *Funct. Foods Heal. Dis.* 5 : 209–223.
- Masood, R.K., Shoaib, M., & Falak, S. (2017). Relationship of platelet-lymphocyte ratio with severity of obstructive sleep apnea syndrome. *Med. Forum Mon.* 28 : 110–114.
- May, A.M., & Mehra, R. (2014). Obstructive sleep apnea: Role of intermittent hypoxia and inflammation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 35 : 531–544.
- McNamee, E.N., Korn Johnson, D., Homann, D., & Clambey, E.T. (2013). Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol. Res.* 55 : 58–70.
- Meliala, A., Narwidina, P., & Sumarno, Y.T. (2024). Antioxidative Parameters Improvements on Nutritional Approach: A Study on Hypoxic Multiple Organs of Sprague-Dawley. *HAYATI J. Biosci.* 31 : 59–70.
- Mousa, F., Ali, A., Nasir, M., & Khattak, K. (2021). Saudi Journal of Biological Sciences Comparative anticancer activities of Ficus carica and Ficus salicifolia latex in MDA-MB-231 cells. *Saudi J. Biol. Sci.* 28 : 3225–3234.
- Nakayama, K., & Kataoka, N. (2019). Regulation of gene expression under hypoxic conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Neha, K., Haider, R., Pathak, A., & Yar, M.S. (2019). European Journal of Medicinal Chemistry Medicinal prospects of antioxidants : A review 178.
- Nuri, Z.N., & Uddin, S. (2021). A review on nutritional values and pharmacological importance of Ficus carica 2 : 7–11.
- Pisoschi, A.M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97 : 55–74.
- Rahmani, A.H., & Aldebasi, Y.H. (2017). Ficus carica and its constituents role in management of diseases FICUS CARICA AND ITS CONSTITUENTS ROLE IN MANAGEMENT OF DISEASES.
- Rasool, I.F. ul, Aziz, A., Khalid, W., Koraqi, H., Siddiqui, S.A., AL-Farga, A., *et al.* (2023). Industrial Application and Health Prospective of Fig (Ficus carica) By-Products. *Molecules* 28.

- Rezagholizadeh, L., Aghamohammadian, M., Oloumi, M., Banaei, S., Mazani, M., & Ojarudi, M. (2022). Inhibitory effects of *Ficus carica* and *Olea europaea* on pro-inflammatory cytokines: A review. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 25 : 268–275.
- Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, N.D. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* 176 : 139–148.
- Saleem, M. (2022). Phytochemical Profile and Biological Activities of *Ficus carica* Fruit ' s Extract 1–23.
- Saqib, S., Haseeb, A., & Khan, F.H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants : Classical team with new players 1–13.
- Schrottmaier, W.C., Mussbacher, M., Salzmann, M., & Assinger, A. (2020). Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis* 307 : 109–120.
- Schumacker, P.T. (2011). Lung cell hypoxia: Role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8 : 477–484.
- Sforza, E., & Roche, F. (2016). Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia* 99.
- Shi, X., Yang, J., Wen, X., Tian, F., & Li, C. (2021). Oxygen vacancy enhanced biomimetic superoxide dismutase activity of CeO₂-Gd nanozymes. *J. Rare Earths* 39 : 1108–1116.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* 7 : 122–126.
- Silveira Coelho, M., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2014). Chemical Characterization of CHIA (*Salvia hispanica* L.) for Use in Food Products. *J. Food Nutr. Res.* 2 : 263–269.
- Song, J., Sundar, K., Gangaraju, R., & Prchal, J.T. (2017). Regulation of erythropoiesis after normoxic return from chronic sustained and intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 123 : 1671–1675.
- Soumya, N.P.P., Mini, S., Sivan, S.K., & Mondal, S. (2021). Bioactive compounds in functional food and their role as therapeutics. *Bioact. Compd. Heal. Dis.* 4 : 24–39.
- Su, L., Zhang, J., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., *et al.* (2019). Review Article Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis , Autophagy , and Ferroptosis 2019.
- Subrata Kumar Biswas Department (2016). The relationship between inflammation

and oxidative stress - interdependence & promotion. *Oxidative Med. cellular Longev.* 2016 : 17–19.

Taso, O. V, Philippou, A., Moustogiannis, A., & Zevolis, E. (2019). Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases 1–10.

Tortora, G.J.G.J., Wiley, J., Roesch, B., Wojcik, L., Salisbury, B., Gerdes, K., *et al.* (2009). Principles Of Anatomy And Physiology Twelfth Edition.

Tripathi, A.D., Mishra, R., Maurya, K.K., Singh, R.B., & Wilson, D.W. (2018). Estimates for world population and global food availability for global health, The Role of Functional Food Security in Global Health. Elsevier Inc.

Tuder, R.M., Yun, J.H., Bhunia, A., & Fijalkowska, I. (2007). Hypoxia and chronic lung disease. *J. Mol. Med.* 85 : 1317–1324.

Tuleta, I., Stöckigt, F., Juergens, U.R., Pizarro, C., Schrickel, J.W., Kristiansen, G., *et al.* (2016). Intermittent Hypoxia Contributes to the Lung Damage by Increased Oxidative Stress, Inflammation, and Disbalance in Protease/Antiprotease System. *Lung* 194 : 1015–1020.

Unnikrishnan, D., Jun, J., & Polotsky, V. (2015). Inflammation in sleep apnea: An update. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16 : 25–34.

Uses, H. (2021). Superoxide Dismutase Administration : A Review of Proposed Human Uses 1–40.

Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., & Kuc, K. (2016). Redox - and non - redox - metal - induced formation of free radicals and their role in human disease.

Verma, R.K., Ibrahim, M., & Garcia-Contreras, L. (2015). Lung anatomy and physiology and their implications for pulmonary drug delivery. *Pulm. Drug Deliv. Adv. Challenges* 1–18.

Wang, Y., Hai, B., Ai, L., Cao, Y., Li, R., Li, H., *et al.* (2018). Tempol relieves lung injury in a rat model of chronic intermittent hypoxia via suppression of inflammation and oxidative stress. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 21 : 1238–1244.

Xiao, F., Li, X., Wang, J., & Cao, J. (2019). Mechanisms of vascular endothelial cell injury in response to intermittent and/or continuous hypoxia exposure and protective effects of anti-inflammatory and anti-oxidant agents. *Sleep Breath.* 23 : 515–522.

Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation 9.

Yang, J.J., Wang, S.J., Gao, X.L., Wang, B., Dong, Y.T., Bai, Y., *et al.* (2018). Toll-like receptor 4 (TLR-4) pathway promotes pulmonary inflammation in

chronic intermittent hypoxia-induced obstructive sleep apnea. *Med. Sci. Monit.* 24 : 7152–7161.

Yeo, E.J. (2019). Hypoxia and aging. *Exp. Mol. Med.* 51.

Yi, L., Ma, S., & Ren, D. (2017). Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities, *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands.

Zhang, X., Rui, L., Wang, M., Lian, H., & Cai, L. (2018). Sinomenine attenuates chronic intermittent hypoxia-induced lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Med. Sci. Monit.* 24 : 1574–1580.

Zhang, Z.A., Sun, Y., Yuan, Z., Wang, L., Dong, Q., Zhou, Y., *et al.* (2022). Insight into the Effects of High-Altitude Hypoxic Exposure on Learning and Memory. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022.

Zhao, Y.N., Wang, H.Y., Li, J.M., Chen, B.Y., Xia, G., Zhang, P.P., *et al.* (2016). Hippocampal mitogen-activated protein kinase activation is associated with intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea syndrome. *Mol. Med. Rep.* 13 : 137–145.




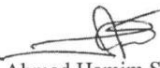



Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., & Best, T.M. (2015). Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* 214 : 329–348.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kuisioner *Clinical Health Scoring System*

Clinical Sign	Clinical Health Score			
	0 - Normal	1 - Mildly Abnormal	2 - Moderately Abnormal	3 - Severely Abnormal
Body Weight (Loss)	No loss	<5%	5-19%	≥20%
Attitude/ Activity	Bright and alert; interested in the environment; interacts with cagemates; looks at observer; when nudged, moves away or sniffs observer	Less interested in the environment; interacts less with cagemates; disregards observer; when nudged, reluctantly moves away or hyperactive	Isolated from cagemates; sits in corner of cage; does not readily move when cage disturbed (only moves when touched); when nudged, pauses before moving away slowly	Immobile or hyperreactive, even when nudged; cannot right itself
Appearance	Shiny, well kept coat; long twitching whiskers; bright & clear eye; erect ears; pink mucous membranes	Unkempt, dull or soiled coat; whiskers clumped	Some piloerection (fur standing up); unkempt fur	Hunched, generalized piloerection, soiled dull fur, dry or dull eyes & nose; pale extremities
Breathing	Normal regular	Rapid or increased effort (chest expansion); sneezing; respiratory sounds, nasal discharge		Gasping; cyanosis
Posture/ Gait	Moves easily about cage; normal posture	Moderate or occasional hunching	Persistent hunching; moves with some difficulty; circling	Severe hunching, immobile; paralysis; unable to access food/water
Hydration	Normal	Slight sunken eyes	Sunken eyes or skin tent that resolve with fluid resuscitation (Subcutaneous)	Skin tent (>2 seconds); obviously sunken eyes; decreased urine output
<p>* A score of 1 or 2 in any category results in increased monitoring, including: daily weighing, supportive care (e.g. supplemental heat, SQ fluids, gel food or food treats/moistened pellets on cage floor)</p> <p>** A score of 3 in any category or a cumulative score of >5 after appropriate supportive care requires immediate euthanasia</p>				

Lampiran 2. *Ethical Clearance*

 MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC) FACULTY OF MEDICINE, PUBLIC HEALTH AND NURSING UNIVERSITAS GADJAH MADA – DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL 				
ETHICS COMMITTEE APPROVAL				
Ref. No. : KE/FK/0362/EC/2023				
Title of the Research Protocol	: Peran Buah Tin (<i>Ficus carica</i>) Kering: Antioksidan Penangkal Stres Oksidatif Akibat Induksi Hipoksia-Reoksigenasi			
Document(s) Approved and version	: Study Protocol version 02 2023			
Principle Investigator	: dr. Andreanyta Meliala, Ph.D., AIFM.			
Participating Investigator(s)	: 1. dr. Siswanto, Sp.P(K)-Onk. 2. dr. Irwan Supriyanto, Ph.D., Sp.KJ. 3. dr. Rifda El Mahroos 4. Dini Anggraini, S.Si. 5. Shellya Puti Sudesty, S.Pd.			
Date of Approval	: 06 MAR 2023 (Valid for one year beginning from the date of approval)			
Institution(s)/place(s) of research	: Laboratorium hewan coba Departemen Fisiologi FK-KMK UGM dan Laboratorium Riset Terpadu, FK-KMK, UGM			
<p>The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the document above meets the ethical principle outlined in the International and National Guidelines on ethical standards and procedures for researches involving animal.</p> <p>The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) has the right to monitor the research activities at any time.</p> <p>The investigator(s) is/are obliged to submit:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Progress report as a continuing review (state its due time)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Report of any serious events</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Final report upon the completion of the study</p>				
 Prof. dr. Madarina Julia, Sp.A(K), MPH., Ph.D. Panel's chairperson	 dr. Ahmad Hamim Sadewa, Ph.D. Panel's secretary			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%;"> P.S: This letter uses signature scan of the panel's chairperson and Secretary of the Ethics Committee. The hardcopy official letter with authority's signature will be issued when it is possible and are kept as an archive of the Ethics Committee </td> <td style="width: 30%;"> Validation number : 6407042302fb9 (http://komisietik.fk.ugm.ac.id/validasi) </td> <td style="width: 10%; text-align: center;">  </td> </tr> </table>		P.S: This letter uses signature scan of the panel's chairperson and Secretary of the Ethics Committee. The hardcopy official letter with authority's signature will be issued when it is possible and are kept as an archive of the Ethics Committee	Validation number : 6407042302fb9 (http://komisietik.fk.ugm.ac.id/validasi)	
P.S: This letter uses signature scan of the panel's chairperson and Secretary of the Ethics Committee. The hardcopy official letter with authority's signature will be issued when it is possible and are kept as an archive of the Ethics Committee	Validation number : 6407042302fb9 (http://komisietik.fk.ugm.ac.id/validasi)			
Recognized by Forum for Ethical Review Committees in Asia and the Western Pacific (FERCAP) 2-Mar-23				



MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)
FACULTY OF MEDICINE, PUBLIC HEALTH AND NURSING
UNIVERSITAS GADJAH MADA – DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL



AMANDMENT APPROVAL

The Ethical Committee of Research in Medical Health, Faculty of Medicine, Public Health, and Nursing, has carefully reviewed the protocol entitled:

Peran Buah Tin (*Ficus carica*) Kering: Antioksidan Penangkal Stres Oksidatif Akibat Induksi Hipoksia-Reoksigenasi

Reference Number of Ethical : KE/FK/0362/EC 6 Maret 2023

Approval Letter

Name of Principal Investigator : dr. Andreanyta Meliala, Ph.D., AIFM.


Name of Institution : Faculty of Medicine, Public Health, and Nursing
Universitas Gadjah Mada

And approved the submitted amendment of document :

Title of the Research Protocol : Peran Buah Tin (*Ficus carica*) : Antioksidan Penangkal Stres Oksidatif Akibat Induksi Hipoksia-Reoksigenasi

Document(s) Approved and version : Study Protocol version Amandment 2023

Yogyakarta, 15 MAY 2023


Prof. dr. Madarina Julia, Sp.A(K), MPH., Ph.D.
Panel's Chairperson

P.S: This letter uses signature scan of the panel's chairperson and Secretary of the Ethics Committee. The hardcopy official letter with authority's signature will be issued when it is possible and are kept as an archive of the Ethics Committee

Validation number :
6461e15e4e9b0
(<http://komisietik.fk.ugm.ac.id/validasi>)



Recognized by Forum for Ethical Review Committees in Asia and the Western Pacific (FERCAP)
11-May-23

Lampiran 3. *Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley



UD. ABADI JAYA Since 2007

PETERNAKAN HEWAN UJI

Jl. Ring Road Utara, Gandok gg. Narodo No: 3X, Condong Catur,
Depok Sleman, Yogyakarta 55283, Telp. 083840598002,
085228117444

SURAT KETERANGAN

No. 34 / AJ / 32 / IV / 2023

Yang bertanda tangan dibawah ini atas nama UD. ABADI JAYA menerangkan bahwa

Nama : Dini Anggraini

Nim : 21/489264/PKU/19868

Institusi : Universitas Gadjah Mada

Prodi : Magister Ilmu Biomedik

Alamat : Jl. Farmako, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Telah melakukan pembelian (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley, jenis kelamin jantan, dalam keadaan sehat.

Guna Penelitian Dengan Judul :

Pengaruh Pemberian Ficus carica terhadap stres oksidatif paru pada tikus sprague dawley yang diinduksi hipoksia intermiten kronis

Pembelian dilakukan pada tanggal 03 Juli 2023.

Demikian, semoga surat keterangan ini dapat digunakan sebaik-baiknya.

Yogyakarta, 03 Juli 2023



UD. ABADI JAYA

Jl. Ring Road Utara, Gandok gg. Narodo No: 3X, Condong Catur, Depok Sleman, Yogyakarta 55283

Telp: 083840598002

(AdeskyTofa S.)

Lampiran 4. Peralatan induksi hipoksia

