

LEVEL ANTIOKSIDAN SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) MENURUN PADA JARINGAN GINJAL TIKUS HIPERKOLESTEROLEMIA : SUATU KAJIAN IMUNOHISTOKIMIA

THE LEVEL OF ANTIOXIDANT SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) DECREASED IN THE KIDNEY TISSUES OF HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS : AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Tutik Wresdiyati¹, Made Astawan², dan Vera Di Nurwati¹

¹Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan,

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi profil kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD, secara imunohistokimia, pada jaringan ginjal tikus hiperkolesterolemia. Dua puluh ekor tikus jantan galur Wistar telah digunakan pada penelitian ini. Tikus tersebut dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu; (1) kelompok kontrol, dan (2) kelompok hiperkolesterolemia, yang diberi pakan mengandung 1% kolesterol selama delapan minggu. Kadar kolesterol dianalisa pada saat sebelum dan sesudah perlakuan. Jaringan ginjal tikus diambil di akhir perlakuan, lalu diproses dengan metode standar embedding menggunakan parafin. Kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan ginjal diamati dengan secara kualitatif pada bagian korteks dan medula, glomeruli, tubuli distalis, dan tubuli proksimalis. Pengamatan tersebut juga dilakukan secara kuantitatif pada inti sel tubuli distalis dan tubuli proksimalis berdasarkan intensitas warna terhadap produk reaksi enzim SOD tersebut. Level antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan ginjal tikus kelompok hiperkolesterolemia lebih rendah dibandingkan pada kelompok kontrol ($P < 0,05$).

Kata kunci: Superoksida dismutase (SOD), imunohistokimia, hiperkolesterolemia, ginjal, tikus

ABSTRACT

The present study was conducted to observe the profile of antioxidant -superoxide dismutase (SOD) immunohistochemically in the kidney tissues of hypercholesterolemic rats. Twenty male Wistar rats were used for this study. Those rats were divided into two groups; (1) Control group, and (2) Hypercholesterolemic group, which were fed diet containing 1% cholesterol for eight weeks. Total cholesterol was analyzed before and after treatment. Rat kidneys were taken at the end of treatment, and processed by using paraffin embedding standard method. Immunohistochemically observation of Cu,Zn-SOD content in the rat kidney tissues were done qualitatively in the area of renal cortex and medulla, glomerulus, distal tubules and proximal tubules, as well as quantitative observation in the nucleus of distal tubules and proximal tubules based on colour intensity of enzyme reaction products. The level of antioxidant-Cu,Zn-SOD in the tissues of rats showed significantly lower in the hypercholesterolemic group compared to the control group ($P < 0.05$).

Key words: Superoxide dismutase (SOD), immunohistochemistry, hypercholesterolemia, kidney, rat

PENDAHULUAN

Kondisi hiperkolesterolemia ditandai dengan meningkatnya kadar total kolesterol darah melebihi 200 mg/dL. Hal ini biasanya diikuti dengan tingginya kadar *low density lipoprotein* (LDL), yang membawa sekitar 60% kolesterol (Groff *et al.*, 1995) dari hati ke jaringan perifer. Kadar LDL yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya aterosklerosis, dan berlanjut dengan penyakit jantung koroner. LDL merupakan jenis lipoprotein yang mudah teroksidasi. Hasil samping dari oksidasi adalah radikal bebas.

Radikal bebas merupakan suatu atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Hal inilah yang menyebabkan radikal bebas bersifat reaktif untuk mendapatkan pasangan elektronnya. Dalam jumlah tertentu radikal bebas sangat diperlukan oleh tubuh dalam membantu proses-proses fisiologis dengan cara transfer elektron. Namun apabila radikal bebas terdapat dalam jumlah yang berlebihan, maka akan terjadi kondisi stres oksidatif, dimana terjadi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan intrasel. Stres oksidatif dapat terjadi karena faktor-faktor tertentu seperti defisiensi antioksidan atau produksi radikal bebas yang berlebihan. Kondisi stres oksidatif mengakibatkan kerusakan fisiologis dan biokimia tubuh yang menghasilkan gangguan metabolisme sampai kematian sel. Radikal bebas yang berlebihan akan menyerang biomakromolekul seperti lipida, polisakarida, asam deoksiribonukleat (DNA), dan dapat menyebabkan terjadinya destruksi protein. Kerusakan tersebut mengakibatkan terjadinya beberapa penyakit dan proses degenerasi, seperti penuaan dan karsinogenesis (Ames dan Shigenaga, 1992).

Tubuh mempunyai sistem pertahanan terhadap radikal bebas yang berupa antioksidan. Antioksidan adalah suatu substansi yang menghentikan atau menghambat kerusakan oksidatif terhadap suatu molekul target (Halliwell dan Gutteridge, 1996). Terdapat dua jenis antioksidan, yaitu (1) antioksidan eksogen, seperti vitamin C dan

vitamin E, dan (2) antioksidan endogen yang biasa disebut antioksidan intrasel dalam bentuk enzim. Enzim antioksidan yang terdapat di dalam sel meliputi *catalase*, *glutathione peroxidase*, dan *superoxide dismutase* (Asayama *et al.*, 1996); *copper zinc-superoxide dismutase* (Cu,Zn-SOD) (Fridovich, 1975) dan *manganese superoxide dismutase* (Mn-SOD) (Marklund, 1984).

Copper, zinc-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) merupakan salah satu antioksidan endogen yang berperan penting dalam mengkatalisis radikal bebas *anion superoxide* menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen (Mates *et al.*, 1999). Dengan kemajuan teknik imunositokimia, sel-sel penghasil *superoxide dismutase* telah berhasil dideteksi pada jaringan tikus (Dobashi *et al.*, 1989; Wresdiyati dan Makita, 1997). Selain terdapat pada jaringan normal, *superoxide dismutase* juga ditemukan pada jaringan neoplastik (Keller *et al.*, 1991). Profil antioksidan *superoxide dismutase* juga telah dilaporkan pada kondisi patologis seperti stress dan diabetes mellitus (Wresdiyati *et al.*, 2002; Wresdiyati *et al.*, 2003; Wresdiyati, 2003). Namun demikian, masih sangat minim informasi ilmiah tentang profil SOD jaringan pada berbagai kondisi patofisiologis dan beberapa penyakit, terutama pada kondisi hiperkolesterolemia.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi profil kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD, secara imunohistokimia, pada jaringan ginjal tikus hiperkolesterolemia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar dalam upaya mengatasi kelainan antioksidan intrasel terutama Cu,Zn-SOD pada kondisi hiperkolesterolemia.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan dan sampling

Dua puluh ekor tikus jantan galur Wistar (200±5 g) yang telah digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan Jakarta. Tikus percobaan diadaptasikan terlebih dahulu terhadap lingkungan kandang percobaan selama

dua minggu. Pengambilan darah dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan untuk pemeriksaan kadar kolesterol. Tikus tersebut dibagi dalam dua kelompok perlakuan, yaitu (1) kelompok kontrol diberi pakan dengan ransum standar (Tabel 1) *ad libitum*. dan (2)

Tabel 1. Komposisi ransum standar

Komponen	Kadar
Air (%)	10,26
Abu (% bk)	10,24
Protein (%bk)	25,04
Lemak (%bk)	6,21
Serat kasar (%)	6,00
Karbohidrat (%bk)	42,26

kelompok hiperkolesterolemia yang diberi perlakuan dengan pakan berkadar kolesterol 1% selama dua bulan. Di akhir perlakuan, tikus dikorbankan dengan cara dislokasio *cervicalis* dan spesimen ginjal diambil untuk analisis Cu,Zn-SOD secara imunohistokimia.

Pengukuran kadar kolesterol darah

Kadar kolesterol darah pada kedua kelompok perlakuan diukur sebelum dan sesudah perlakuan dengan menggunakan Boehringer kit. Hal ini dilakukan untuk membandingkan kadar kolesterol darah antara sebelum dan sesudah perlakuan maupun antara kelompok kontrol dengan kelompok hiperkolesterolemia.

Pemrosesan dan Pewarnaan Jaringan dengan Teknik Imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD

Spesimen jaringan ginjal tikus difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam, diikuti dengan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan *clearing* dengan silol sebelum dilakukan *embedding* dalam paraffin. Blok jaringan yang didapat kemudian dipotong setebal 4 µm menggunakan mikrotom, yang selanjutnya dilakukan pewarnaan imunohistokimia pada potongan jaringan tersebut terhadap antioksidan intrasel Cu,Zn-SOD.

Deteksi Cu,Zn-SOD dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode Dobashi *et al.* (1989) dengan modifikasi. Setelah dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi, potongan jaringan diberi perlakuan H₂O₂ 3% (10 menit) untuk inaktivasi peroksidase endogen. Kemudian potongan jaringan diinkubasi dalam serum normal 10% (30 menit) pada suhu 37°C. Potongan jaringan lalu dicuci dengan bufer fosfat sebelum diinkubasi dalam antibodi primer, yaitu antibodi monoklonal Cu,Zn-SOD (Sigma S2147) pada suhu 4°C. Potongan jaringan diinkubasi lagi dalam antibodi sekunder yang telah dilabel polimer peroksidase (Dako K1491) pada suhu 37°C. Produk reaksi antigen-antibodi dalam potongan jaringan divisualisasi dengan *diamino benzidine* (DAB) selama 25 menit pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat dan penjernihan dengan silol, serta penutupan potongan jaringan dengan kaca penutup menggunakan perekat. Sebagai kontrol, digunakan potongan jaringan yang diinkubasi menggunakan bufer fosfat sebagai pengganti antibodi monoklonal Cu,Zn-SOD (Dobashi *et al.*, 1989).

Pewarnaan imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD dilakukan untuk mendeteksi sel-sel penghasil Cu,Zn-SOD yang dapat menunjukkan jumlah sel penghasil serta kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD. Hal ini untuk mengetahui level antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan ginjal tikus kelompok hiperkolesterolemia dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Observasi dan Analisa Data

Hasil pewarnaan potongan jaringan dengan imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD diamati dan didokumentasikan dengan mikroskop cahaya (Olympus, Vanox) dan mikrofoto (Nikon E600). Pengamatan terhadap sel-sel penghasil Cu,Zn-SOD dilakukan dengan dua cara, yaitu (i) pengamatan kualitatif, dan (ii) pengamatan kuantitatif. Pengamatan kualitatif dilakukan terhadap produk reaksi positif pada bagian medula dan korteks ginjal seperti glomeruli, tubuli distalis dan tubuli

proksimalis ginjal dengan membandingkan intensitas warna coklat yang terbentuk dan distribusinya pada seluruh bagian setiap preparat yang diamati. Intensitas warna coklat tersebut menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD, warna coklat yang semakin tua dan semakin merata berarti mengandung semakin banyak Cu,Zn-SOD (Kiernan, 1990).

Pengamatan kuantitatif dilakukan terhadap inti sel tubuli distalis dan tubuli proksimalis ginjal yang memberikan reaksi positif pada berbagai tingkat kandungan terhadap Cu,Zn-SOD (coklat tua atau positif kuat/+++), coklat sedang sampai coklat muda atau positif sedang/lemah/+++, dan putih atau negatif/-) (Wresdiyati *et al.*, 2002; Wresdiyati *et al.*, 2003). Penghitungan inti sel-sel tersebut dilakukan tiap lapang pandang pada pembesaran 400x, yang dilakukan pada lima lapang pandang yang berbeda secara acak pada setiap preparat jaringan (Wresdiyati and Makita 1995; Wresdiyati *et al.*, 2002; Wresdiyati *et al.*, 2003). Setiap sampel jaringan ginjal dibuat preparat duplo dengan lokasi yang berbeda, sehingga dari setiap kelompok perlakuan tikus dihasilkan data jumlah inti sel tubuli renalis dengan berbagai tingkat kandungan dari 50 lapang pandang (n). Data hasil penghitungan tersebut kemudian dianalisis dengan *t-test* ($P < 0,05$) untuk setiap tingkatan kandungan Cu,Zn-SOD pada kedua kelompok perlakuan. Dengan demikian, secara keseluruhan dapat diketahui peningkatan atau penurunan kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada kondisi hiperkolesterolemia dibandingkan kelompok kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Hiperkolesterolemia. Tikus kelompok kontrol yang diberi pakan dengan ransum standar selama delapan minggu, kadar kolesterol serumnya, $78,61 \pm 6,30$ mg/dL, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kadar kolesterol serum awal, yaitu $76,31 \pm 8,70$ mg/dL. Penambahan kolesterol 1% dalam pakan yang diberikan pada tikus kelompok hiperkolesterolemia selama delapan minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar

kolesterol serum sebesar 90%, yaitu dari $78,74 \pm 4,28$ mg/dL menjadi $149,67 \pm 1,25$ mg/dL. Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sudah mencapai kondisi hiperkolesterolemia.

Penambahan kolesterol 1% pada pakan selain meningkatkan kolesterol plasma juga meningkatkan kadar kolesterol jaringan. Kolesterol makanan (*dietary cholesterol*) membutuhkan waktu beberapa hari untuk mengimbangi kolesterol dalam plasma dan beberapa minggu untuk mengimbangi kolesterol dalam jaringan (Meiser *et al.*, 1991). Kenaikan kolesterol plasma menunjukkan suatu kelainan metabolisme sebagai hasil dari kegagalan untuk memindahkan lipoprotein dari darah, produksi lipoprotein yang berlebihan atau kombinasi dari keduanya (Gurr, 1992).

Kenaikan kolesterol plasma juga dapat terjadi karena (1) pengambilan lipoprotein yang mengandung kolesterol oleh reseptor, misalnya LDL; (2) pengambilan lipoprotein yang mengandung kolesterol oleh lintasan yang tidak diperantarai reseptor; (3) sintesis kolesterol; (4) hidrolisis ester kolesterol oleh enzim ester kolesterol hidrolase (Mayes, 1995).

Kandungan Cu,Zn-SOD pada Jaringan Ginjal. Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan sel-sel pada jaringan ginjal tikus memberikan reaksi positif terhadap antioksidan Cu,Zn-SOD. Produk reaksi positif tersebut memberikan warna coklat yang terlihat baik pada sitoplasma maupun inti sel tubuli renalis, glomerulus serta daerah medulla. Hasil pengamatan kualitatif terhadap kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD menunjukan adanya penurunan intensitas warna coklat pada kelompok perlakuan hiperkolesterolemia dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan kandungan Cu,Zn-SOD pada kelompok hiperkolesterolemia. Penurunan tersebut terlihat dari semakin banyaknya sel yang memberikan reaksi positif lemah. Penurunan kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan ginjal terlihat lebih jelas terutama pada sel epitel tubuli proksimalis (Tabel 2 dan Gambar 1).

Tabel 2. Distribusi dan intensitas kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada ginjal tikus kelompok kontrol dan kelompok hiperkolesterolemia

Kelompok	Distribusi dan intensitas kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD					
	Medula	Glomeruli	Tubuli Distalis		Tubuli Proksimalis	
			Inti	Sitoplasma	Inti	Sitoplasma
Kontrol	++	++	+++	+++	+++	+++
Hiperkolesterolemia	++	-	++	+	+	-

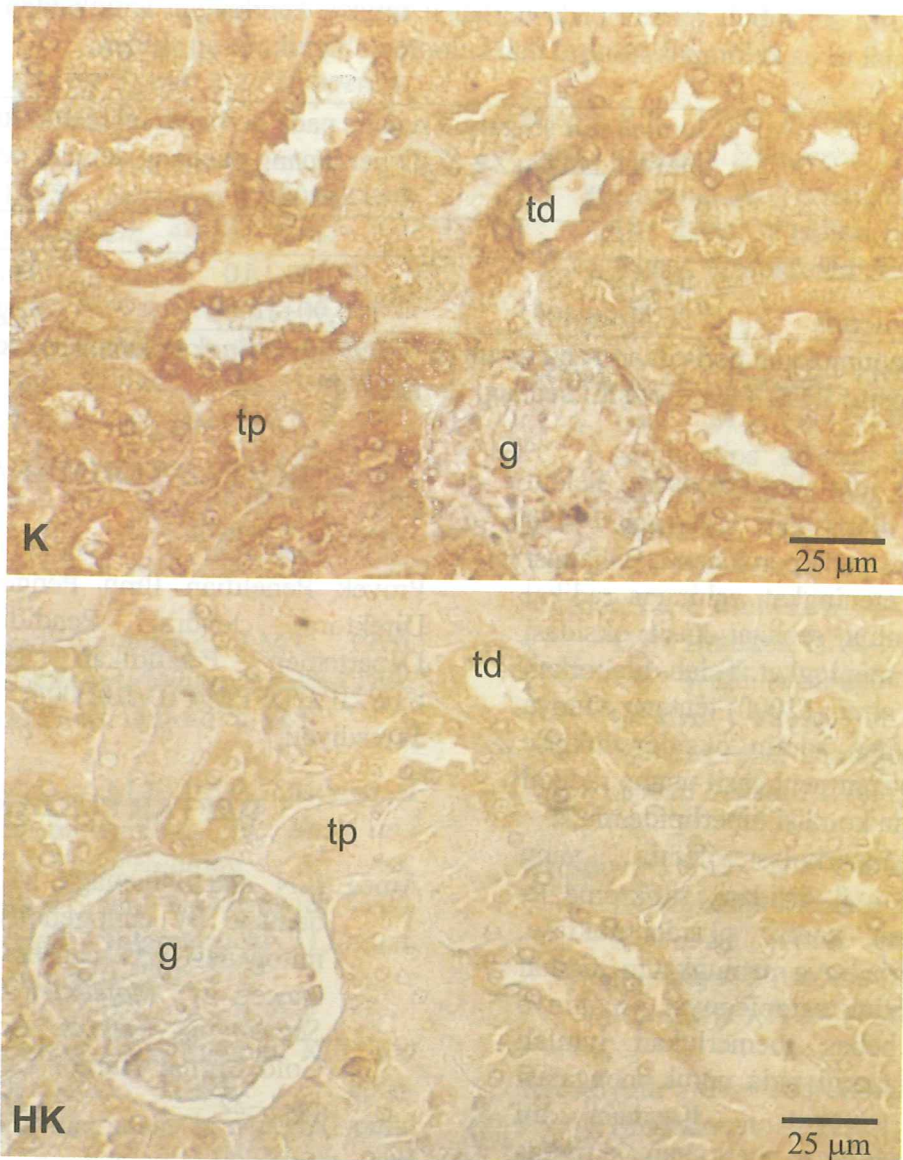
Keterangan : nilai + dan - menunjukkan intensitas kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada setiap bagian ginjal

Level antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan ginjal tikus kelompok perlakuan hiperkolesterolemia juga terlihat dari hasil penghitungan secara kuantitatif terhadap inti sel epitel tubuli renalis yang memberikan reaksi pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD terhadap antioksidan tersebut. Hasil penghitungan terhadap inti sel tubuli renalis per lapang pandang dengan pembesaran 400x pada kelompok kontrol yang memberikan reaksi positif kuat (+++), positif sedang-lemah (++/+), dan negatif (-) berturut turut adalah 84,20, 99,20 dan 16,67. Sedangkan pada kelompok perlakuan hiperkolesterolemia berturut turut jumlah inti sel tubuli renalis tersebut adalah 26,40, 140,90, dan 24,91 (Tabel 3). Hasil uji statistika terhadap jumlah inti sel tubuli renalis tersebut juga menunjukkan adanya penurunan kandungan Cu,Zn-SOD yang nyata ($P < 0,05$) pada kelompok hiperkolesterolemia dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan tersebut terlihat dari penurunan yang nyata ($P < 0,05$) jumlah inti sel tubuli renalis yang memberikan reaksi positif kuat pada kelompok perlakuan. Penurunan kandungan Cu,Zn-SOD pada kelompok perlakuan tersebut juga terlihat dari peningkatan yang nyata ($P < 0,05$) jumlah inti sel tubuli renalis yang memberikan reaksi positif lemah dan reaksi negatif dibandingkan kelompok kontrol.

Kondisi hiperkolesterolemia biasanya diikuti dengan tingginya kadar *low density lipoprotein* (LDL), yang membawa sekitar 60% kolesterol (Groff *et al.*, 1995) dari hati ke jaringan perifer. Metabolisme LDL diawali dengan terikatnya partikel LDL pada reseptor

spesifik apo B-100/E, yang terletak pada permukaan sel. Reseptor LDL bereaksi dengan ligan pada LDL dan LDL diambil dalam keadaan utuh melalui endositosis. Setelah melepaskan LDL, reseptor kembali ke permukaan sel. LDL yang terpisah masuk ke dalam lisosom. Di dalam lisosom komponen protein LDL dihidrolisis oleh protease lisosom menjadi asam amino dan komponen ester kolesterolnya dihidrolisis menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kolesterol esterase (Kane dan Malloy, 1997).

Kolesterol bebas, yang dihasilkan dari proses hidrolisis ester kolesterol komponen LDL, mempunyai fungsi regulator sebagai berikut: (a) menurunkan jumlah m-RNA sehingga menekan reseptor LDL dan mencegah masuknya LDL ke dalam sel, (b) mengatur aktivitas kedua enzim mikrosomal yaitu HMG-KoA reduktase dan ACAT. Aktivitas enzim HMG-KoA reduktase dihambat serta laju sintesis kolesterol ditekan, sebaliknya aktivitas ACAT dinaikkan untuk memacu pembentukan ester kolesterol yang bisa disimpan di dalam sitoplasma sel (Groff *et al.*, 1995). Sedangkan asam lemak, yang juga dihasilkan dari proses hidrolisis ester kolesterol komponen LDL, di dalam semua sel tubuh termasuk sel-sel tubuli renalis akan dioksidasi oleh β -oksidasi di mitokondria dan peroksisom. Pada kondisi normal β -oksidasi di peroksisom hanya merupakan jalur minor untuk mengoksidasi asam lemak. Namun dalam kondisi kelaparan, diabetes dan diet tinggi lemak, jalur ini meningkat (Orellana *et al.*, 1992). Meningkatnya β -oksidasi akan meningkatkan



Gambar 1. Fotomikrograf jaringan ginjal tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap kandungan Cu,Zn-SOD. Produk reaksi terhadap Cu,Zn-SOD, yang berupa endapan coklat, pada kelompok hiperkolesterolemia (HK) terlihat lebih pucat dan lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol (K). td= tubuli distalis, tp = tubuli proksimalis, g= glomeruli.

jumlah radikal bebas sebagai hasil sampingnya.

Telah dilaporkan oleh Wresdiyati dan Makita (1995) pada kondisi stres jumlah peroksisom sel-sel tubuli renalis ginjal kerapang meningkat 2,8 kali. Hal ini meningkatkan oksidasi yang terjadi di peroksisom termasuk β -oksidasi, sehingga radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil

sampingnya juga meningkat. Meningkatnya radikal bebas tersebut terlihat dari menurunnya antioksidan Cu,Zn-SOD, yang telah banyak digunakan untuk memerangi radikal bebas, pada jaringan hati dan ginjal tikus di bawah kondisi stres (Wresdiyati *et al.*, 2002; Wresdiyati 2003). Jadi pada kondisi hiperkolesterolemia yang dapat meningkatkan β -oksidasi asam lemak kemungkinan

Tabel 3. Jumlah inti sel tubuli renalis pada berbagai tingkat kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada ginjal tikus kelompok kontrol dan kelompok hiperkolesterolemia

Kelompok	Jumlah inti sel tubuli renalis pada berbagai intensitas kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD per lapang pandang dengan pembesaran 400x		
	+++	++/+	-
Kontrol	84,20±9,30	99,20±2,10	16,67±2,18
Hiperkolesterolemia	26,40±6,40*	140,90±16,80*	24,91±4,91*

Keterangan : * menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol, +++ = positif kuat, ++/+ = positif sedang, - = negatif.

meningkatkan pula jumlah peroksisom. Selain β -oksidasi, telah dilaporkan sitokrom P-450 oksidase yang terjadi pada peroksisom (Dhaunsi *et al*, 1992) juga meningkat, sehingga radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil oksidasi tersebut juga akan meningkat. Telah dilaporkan juga oleh Scheuer *et al.*, (2000) tentang adanya peningkatan aktivitas xantin oksidoreduktase (XO), yang merupakan penghasil utama radikal bebas oksigen, pada kondisi hiperlipidemia.

Kondisi hiperkolesterolemia, yang dapat meningkatkan β -oksidasi, sitokrome P-450 oksidase dan xantin oksidoreduktase, mengakibatkan terjadinya peningkatan radikal bebas sebagai produk sampingnya. Tingginya jumlah radikal bebas memerlukan jumlah antioksidan yang tinggi pula untuk mengatasi radikal bebas tersebut. Keadaan ini menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas dan kandungan enzim-enzim antioksidan termasuk Cu,Zn-SOD, yang terlihat menurun pada kelompok hiperkolesterolemia pada penelitian ini. Penurunan kandungan Cu,Zn-SOD lebih jelas terjadi pada tubuli proksimalis dibandingkan dengan bagian lain dari ginjal. Hal ini disebabkan peroksisom lebih banyak terdapat di tubuli proksimalis ginjal.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kondisi hiperkolesterolemia menurunkan level kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada ginjal tikus. Penurunan level kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD tersebut menunjukkan tingkat produksi radikal bebas yang tinggi pada jaringan ginjal tikus hiperkolesterolemia.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini sebagian dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, No. 63/P2IPT/DPPM/PID/III/2004, a.n. Tutik Wresdiyati.

DAFTAR PUSTAKA

- Ames, B.N. and Shigenaga, M.K. 1992. DNA damage by endogenous oxidants and mitogenesis as causes of aging and cancer. In : *Molecular Biology of Free Scavenging Systems*. Scandalios (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp.1-22
- Asayama, K., Dobashi, K., Kawada, Y., Nakane, T., Kawaoi, A. and Nakazawa, S. 1996. Immunohistochemical localization and quantitative analysis of cellular glutathione peroxidase in fetal and neonatal rat tissues : fluorescence microscopy image analysis. *Histochem. J.* 28(1):63-71.
- Dhaunsi, G.S., Gulati, S., Singh, A.K., Orak, J.K., Asayama, K. and Singh, I. 1992. Demonstration of Cu,Zn-superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 267(10):6870-6873.
- Dobashi, K., Asayama, K., Kato, K., Kobayashi, M. and Kawaoi, A. 1989.

- Immunohistochemical localization and quantitative analysis of superoxide dismutase in rat tissue. *Acta Histochem. Cytochem.* 22:351–365.
- Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44:147–159.
- Groff, J.L., Gropper, S.S. and Hunt, S.M. 1995. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 2nd ed. West Publishing Company. USA. pp. 102–112.
- Gurt, MI. 1992. *Role of Fats in Food and Nutrition*. 2nd ed. Elsevier Applied Science, London. pp. 156–159.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1996. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press. Oxford. p. 301
- Kane, J.P. and Malloy, M.J. 1997. Disorder of lipoprotein metabolism. In : *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th ed. Greenspan FS and GJ Stewler (eds). Prentice-Hall International Limited, London. pp. 230–239.
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. and Halliwell, R.A. 1991. Cu,Zn-superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7381–7385.
- Kiernan, J.A. 1990. *Histological & Histochemical Methods – Theory & Practice*. Second edition. Pergamon Press, London. pp. 330–354.
- Marklund, S.L. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222:649–655.
- Mates, J.M., Gomez, C.P. and Castro, I.N.D. 1999. Antioksidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochem.* 32 (8):595–603.
- Mayes, P.A. 1995. *Sintesis, pengangkutan dan ekskresi kolesterol*. Biokimia. Harper. Hartono A, Terjemahan; Oswan J, dan DH Ronardy editor. Ed ke-22. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. pp. 250–263.
- Orellana, M., Fuentes, O., Rosenbluth, H., Lara, M. and Valdes, E. 1992. Modulation of rats liver peroxisomal and microsomal fatty acids oxidation by starvation. *FEBS* 310: 193–196.
- Scheuer, H., Gwinner, W., Hohbach, J., Grone, E.F., Brandes, R.P., Malle, E., Olbricht, C.J., Walli, A.K. and Grone, H.J. 2000. Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 278(1):F63–74.
- Wresdiyati, T. and Makita, T. 1995. Remarkable increase of peroxisomes in the renal tubule cells of Japanese monkeys under fasting stress. *Pathophysiol.* 2:117–182.
- Wresdiyati, T. and Makita, T. 1997. Immunocytochemical localization of Cu, Zn-SOD (Cooper, zinc-superoxide dismutase) in the renal tubules and glomerulus of rat kidney. *Mol. Biol. Cell.* 8:342.
- Wresdiyati, T., Mamba, K., Adnyane, I.K.M. and Aisyah, U.S. 2002. The effect of stress condition on the intracellular antioxidant copper,zinc-superoxide dismutase in the rat kidney: an immunohistochemical study. *Hayati.* 9(3):85–88.
- Wresdiyati, T. 2003. Immunohistochemical study of oxygen-free radical scavenger superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in the liver of rats under stress condition. *Biota.* VIII(3):107–112.

Wresdiyati, T., Lelana, R.P.A. Adnyane, I.K.M. dan Noor, K. 2003. Immunohistochemical study of superoxide dismutase (SOD) in the liver of diabetic experiment *Macaca fascicularis*. *Hayati*. 10(2):61-65.

Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. This enzyme is found in all aerobic organisms and is essential for the survival of many organisms. In the liver of *Macaca fascicularis*, SOD is primarily located in the cytoplasm of hepatocytes and is also found in the nucleus and mitochondria.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. In this study, we found that the expression of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* was significantly higher than in the control group.

The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*. The increase in SOD expression in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* may be a compensatory mechanism to deal with the increased production of superoxide in the liver.

Further studies are needed to investigate the role of SOD in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*. These studies should include the measurement of SOD activity in the liver and the study of the effect of SOD inhibitors on the liver of diabetic *Macaca fascicularis*.

In conclusion, the study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.

The study of SOD in the liver of diabetic *Macaca fascicularis* is important because it can help to understand the role of SOD in the pathogenesis of diabetes. The results of this study suggest that SOD plays a role in the pathogenesis of diabetes in *Macaca fascicularis*.