

Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant

Eni Widayati

Bagian Kimia-Biokimia FK Unissula Semarang

Abstrak

Pendahuluan: Proses metabolisme aerobik, menyebabkan system oxidasi biologi menghasilkan radikal bebas (ROS) sebanyak 2.5% dari total kebutuhan oksigen atau 3.4 kg/24 jam.

Isi: Stressor seperti radiasi sinar rontgen dan ultraviolet, hipoksia dan hyperoksia, obat, polutan, dan senyawa kimia lain dapat menyebabkan peningkatan produksi ROS. Stressor juga memicu produksi antioksidant enzymatic seperti catalase, hydroperoxidase, dan superoksida dismutase. Produksi ROS akan mengganggu homeostasis atau menstimulasi pertumbuhan sel, tergantung pada seberapa besar produksi ROS. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan, mengarahkan sel menuju stress oxidative. Jika produksi ROS seimbang dengan kapasitas antioksidan, mengarahkan sel pada pertumbuhan. Sumber lain ROS berasal dari reaksi oksidasi biologi dalam tubuh terutama dari mitochondria. Untuk menetralkan efek ROS sel menyediakan antioksidan enzimatik maupun nonenzimatik baik yang larut air maupun larut lemak.

Simpulan: hidup secara aerobik, menghasilkan ROS yang berasal dari reaksi fosforilasi oksidatif. Sel menyediakan antioksidan enzimatik maupun nonenzimatik untuk menetralkan ROS.

Kata kunci: oksidasi biologi, ROS, antioksidan

Abstract

Introductions: Aerobic metabolism process induces production of free radicals (ROS) 2.5% of oxygen consumption or about 3.4 kg/24 hours.

Content: Stressor likes ultraviolet radiation, hypoxia, hyperoxia, pollutant, and other chemical substances could induce ROS production. Stressor also stimulates secretion of antioxidant enzymatic such as catalase, hydroperoxidase, and superoxide dismutase. The ROS produced will disturb homeostasis or stimulate cell growth, dependent on the level of ROS. When the ROS level is overwhelm the antioxidant capacity, cell leading to undergo oxidative stress. If the ROS level and antioxidant capacities are equilibrium, it leading to cell growth. Other resources of ROS result from biologic oxidation reaction particularly from mitochondria. To scavenge ROS, cell has provided several antioxidants water and lipid soluble both enzymatic and non-enzymatic.

Conclusion: The ROS is produced in aerobically life resulted from oxidative phosphorylation chain reaction. Cell provides the antioxidant both enzymatic and non-enzymatic in order to scavenge it.

Keywords: Biologic oxidation, ROS, Antioxidants

Pendahuluan

Sebagai organisme aerobik, manusia atau binatang tingkat tinggi tentu sangat membutuhkan oksigen untuk menjalankan metabolisme basal. Dalam 24 jam paling tidak memerlukan oksigen sebanyak 352.81 lt. Keperluan tersebut dipenuhi dengan bernafas kurang lebih sebanyak 23 ribu kali. Konsekuensi dari proses metabolisme tsb system biokimiawi (oxidasi biologi) dalam tubuh mampu menghasilkan radikal bebas (RB) sebanyak 2.5% dari total kebutuhan oksigen atau sebanyak 3.4 kg/24 jam.¹ Meskipun oksidasi biologi dapat berlangsung tanpa oksigen, namun semua hewan tingkat tinggi mutlak memerlukan suplai oksigen melalui penafasan (respirasi). Respirasi adalah proses pembentukan adenosine trifosfat (ATP) sebagai energy, yang diperoleh dari reaksi antara hydrogen dan oksigen yang kemudian membentuk air.² Reaksi pembentukan energy dikenal sebagai fosforilasi oksidatif yang berlangsung di dalam mitochondria. Berkat peran tersebut maka mitochondria dikenal sebagai dapur

energy sel. Proses respirasi berlangsung di dalam matrix mitochondria melalui suatu rangkaian reaksi yang kemudian disebut sebagai rantai pernafasan.³ Rantai pernafasan tersusun menurut potensial redoksnya, mulai dari substrat yang paling elektronegatif (H^+/H_2) dan berakhir pada substrat yang paling elektro positif (O_2/H_2O).⁴ Jenis reaksi yang berlangsung dalam tubuh tingkat tinggi termasuk manusia adalah oksidasi reduksi. Secara kimiawi oksidasi adalah melepaskan electron, sedangkan reduksi adalah memperoleh electron. Oleh karena itu oksidasi akan selalu diikuti oleh reduksi sebuah acceptor electron. Prinsip inilah yang kemudian dipakai dalam system biokimiawi dan penting sebagai dasar pemahaman terhadap oxidasi biologi yang terjadi di tubuh hewan tingkat tinggi termasuk manusia. Selama respirasi molekul oksigen diinkorporasikan kepada berbagai senyawa oleh enzim oksigenase. Enzim lain yang juga berperan dalam reaksi oksidasi biologi adalah dehydrogenase, hydroperoksidase, dan oxidase yang bekerja sesuai dengan kebutuhan tubuh.^{3,4}

Berbagai stressor baik yang berupa agen fisik (radiasi sinar rontgen dan ultraviolet), kadar oksigen nonfisiologik (hipoksia dan hyperoksia), obat, polutan, senyawa kimia, dan penuaan, dapat menyebabkan gangguan homeostasis sel atau stimulasi terhadap pertumbuhan, pertahanan hidup, dan signaling sel.^{5,6} Gangguan homeostasis atau stimulasi terhadap pertumbuhan, signaling, dan survival sel dimediasi oleh reactive oxygen species (ROS) yang diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap stressor.⁷ Berbagai stressor selain memicu produksi ROS, juga memicu produksi antioksidant enzymatic seperti catalase (CAT), hydroperosidase (HPx), superoksida dismutase (SOD).⁷ Jumlah ROS yang terbentuk akan menjadi gangguan terhadap homeostasis atau stimulasi terhadap pertumbuhan, pertahanan hidup, dan signaling sel, tergantung pada seberapa besar ROS diproduksi. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan yang ada, mengarahkan sel menuju stress oxidative, apoptosis, atau nekrosis. Di sisi lain jika produksi ROS seimbang dengan kapasitas antioksidan, mengarahkan sel pada pertumbuhan, signaling, dan survival. Pembnetukan ROS berlangsung melalui reaksi yang dikatalisis oleh klas enzim oxidases, atau system enzim cytochrome p 450.^{3,4} Di sisi lain, untuk mempertahankan hidup sel juga memiliki respon terhadap stressor melalui mesin pembentuk antioksidan seperti CAT, SOD, dan HPx. Sungguhpun demikian, masih tetap ada ROS yang terbentuk meskipun dalam jumlah yang kecil, oleh karena itu perlu antioksidan tambahan lain seperti vitamin E, vitamin C, flavonoid, asam urat, dll, mengingat rantai reaksi ROS hanya dapat dihentikan dengan reaksi dua ROS secara bersama sehingga dua electron yang tidak berpasangan menjadi berpasangan.

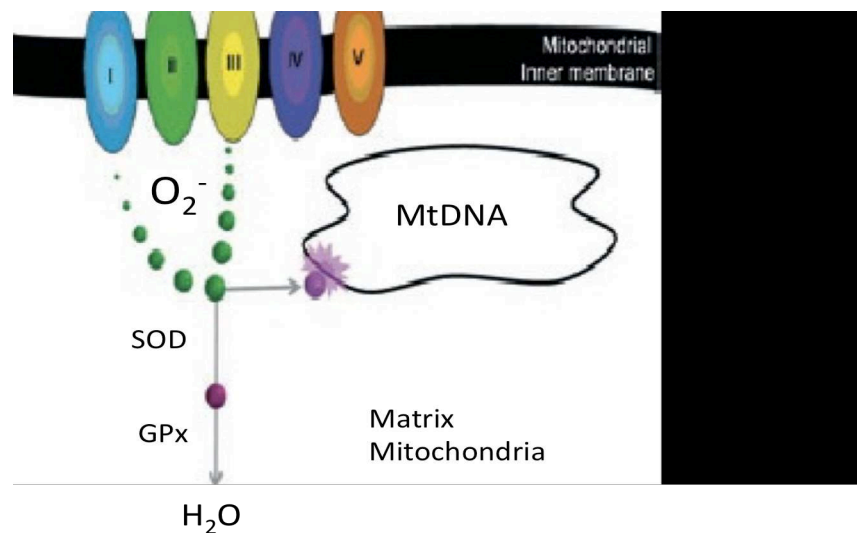
Sumber Pembentukan ROS

ROS merupakan representasi katagori molekul yang luas yang merupakan derivate oksigen radikal dan nonradikal. Derivate oksigen radikal meliputi ion OH, superoksida, nitric oxide, dan peroxy, sedangkan derivate oksigen yang non-radikal meliputi ozone, singlet oksigen, lipid peroksida, dan hydrogen peroksida. Derivate oksigen non-radikal selanjutnya akan mengambil bagian dalam kaskade reaksi yang menghasilkan radikal bebas.^{2,3,8} Selain derivate oksigen, radikal bebas juga dapat berasal dari derivate nitrogen seperti nitric oxide, peroksi nitrit, dan ion nitroksil yang juga merupakan subklas dari ROS.⁹ Berbagai macam ROS tersebut dapat bersumber dari dalam tubuh (intrinsic) atau dari luar tubuh (extrinsic).

Radiasi sinar rontgen maupun sinar ultraviolet merupakan sumber pembentukan ROS yang cukup penting, mengingat kedua sinar tersebut dapat melisiskan air menjadi radikal $\cdot OH$. Selain itu ion logam seperti Fe^{2+} , Co^{2+} dan Cu^+ juga dapat bereaksi dengan oksigen atau hydrogen peroksida (H_2O_2), menghasilkan radikal $\cdot OH$.^{4,9} Nitric oksida, suatu senyawa yang penting untuk relaksasi pembuluh darah, selain merupakan senyawa radikal bebas, juga dapat bereaksi dengan superoksida menghasilkan peroksinitrit, yang kemudian dapat membentuk radikal $\cdot OH$.⁹ Sumber ROS yang lain adalah berasal dari respiratory burst dari macrofag yang teraktifkan. Aktivasi macrofag ini menyebabkan peningkatan penggunaan glukosa melalui lintasan pentose fosfat yang dipakai untuk mereduksi NADP menjadi NADPH, dan peningkatan penggunaan oksigen yang dipakai untuk mengoksidasi NADPH guna

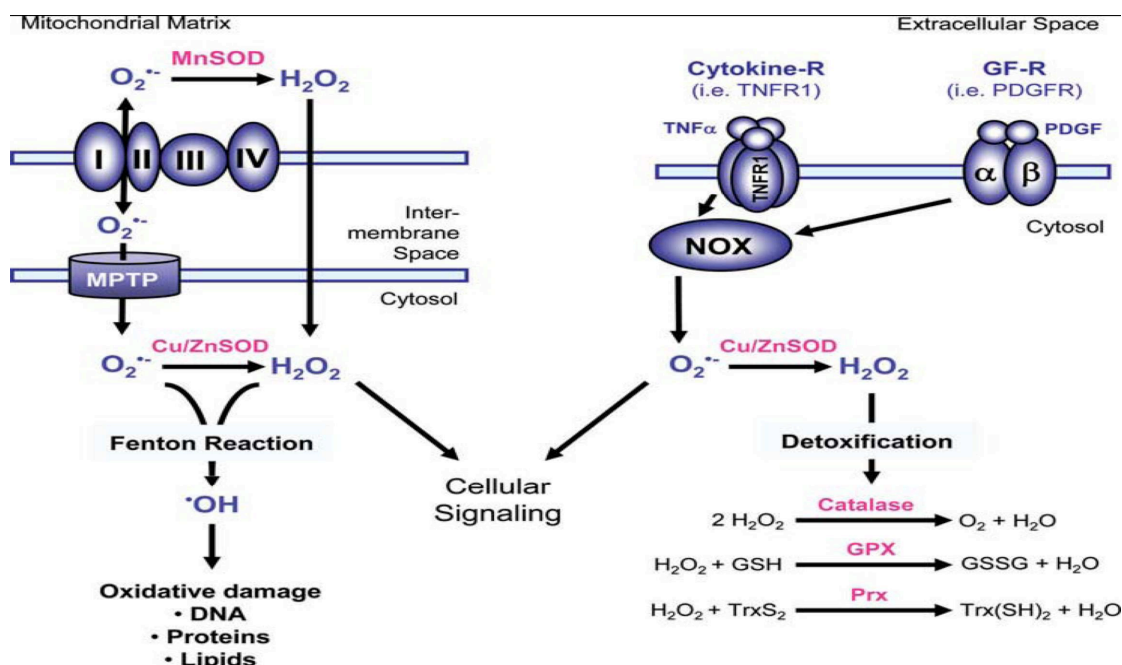
menghasilkan superoksida dan halogen radikal sebagai agen yang sitotoksik untuk membunuh mikroorganisme yang telah difagosit.^{4,9}

Oksidasi terhadap coenzim flavin tereduksi di dalam mitochondria dan rangkaian transport electron dalam mikrosome berlangsung melalui serangkaian langkah, dimana radikal flavin semiquanon distabilkan oleh protein pengikat, dan membentuk radikal oksigen (superoksida) sebagai hasil sementara atau sampingan. Meskipun hasil akhirnya bukanlah radikal bebas, namun akibat dari sifat radikal yang tidak dapat diprediksi, diperkirakan terdapat kebocoran radikal bebas, sebanyak 3 – 5% dari 30 mol oksigen yang dikonsumsi setiap hari atau sebanyak 1.5 mol ROS.^{4,10} Jadi pembentukan ROS di dalam mitochondria selain oleh kebocoran electron kronis dari rantai pernafasan normal, juga dipicu oleh *respiratory burst* intra mitochondrial, cytoplasma, maupun ROS yang berasal dari luar. Di dalam mitochondria superoksida dikonversi menjadi hydrogen peroksida yang dapat menyebar dan kemudian dikonversi menjadi radikal $\cdot\text{OH}$ yang bersifat mutagenic. Oleh karena itu produksi ROS dalam mitochondria menjadi hal penting dalam berbagai pathogenesis penyakit. (gambar 1)¹⁰



Gambar 1. Pembentukan ROS di Mitochondria

Kadar ROS pada kelainan sel (kanker) bahkan sangat tinggi. Hal ini disebabkan oleh aktivitas metabolisme yang tinggi, disfungsi mitochondria, aktivitas peroksisom, peningkatan signaling reseptor sel, aktivitas oncogen, aktivitas oksidases, cyclooxygenases, lipooksigenases, and thymidine fosforilase, atau melalui reaksi silang dengan infiltrasi sel immune.⁸ Rangkaian transport electron fosforilasi oksidatif dalam mitochondria menghasilkan ROS sebagai hasil samping yang tidak dapat dihindari. Rangkaian transport electron tersebut meliputi kompleks satu sampai empat dan ATP synthase yang terletak pada membrane dalam mitochondria. Kurang lebih 80% superoksida yang dibentuk pada kompleks I dan III, dilepas pada ruang diantara membrane dalam mitochondria, sedangkan 20% sisanya dilepas ke matriks mitochondria.¹¹ Permeabilitas transition pore mitochondria (PTPM) di membrane luar mitochondria memungkinkan superoksida bocor ke sitoplasma, yang kemudian dirubah menjadi H_2O_2 baik di matriks mitochondria atau di sitoplasma oleh SOD. Berbagai data mutakhir menunjukkan bahwa hydrogen peroksida dapat menembus membrane sel melalui aquaporin spesifik (7) seperti aquaporin 8. Aquaporin 8 telah dapat dideteksi pada membrane dalam mitochondria dan menunjukkan fungsi sebagai saluran air dan hydrogen peroksida.⁸ Selain mitochondria peroksisom juga merupakan sumber pembentukan ROS. Di dalam organel respiratory superoksi dan hydrogen peroksida dibentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim xanthin oxidase pada matriks dan membrane peroksisom. (gambar 2)⁸



Gambar 2. Produksi ROS pada Kanker

ROS Sebagai Penyebab Kerusakan Sel (Stress Oksidatif)

ROS adalah molekul yang tidak berpasangan dan oleh karena itu sangat tidak stabil dan sangat reaktif. ROS hanya dapat bertahan dalam hitungan millisecond ($10^{-9} - 10^{-12}$) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan dirinya.^{3,9,12} Diketahui berbagai macam ROS, namun yang paling banyak dipelajari karena efeknya yang berbahaya dan merusak adalah superoksida (O_2^-), hydroxyl (OH), dan perhydroxyl (O_2H).^{9,10,13} Kerusakan jaringan akibat serangan ROS dikenal dengan stress oxidative, sedangkan factor yang dapat melindungi jaringan terhadap ROS disebut antioksidant. Berbagai jaringan yang dapat mengalami kerusakan akibat ROS di antaranya adalah Deoxyribo Nucleic Acid (DNA), lipid, dan protein. Interaksi ROS dengan basa dari DNA dapat merubah struktur kimia DNA, apabila tidak direparasi akan mengalami mutasi yang dapat diurunkan, terutama bila terjadi pada DNA sel germinal baik di dalam ovarium maupun testis, sedangkan kerusakan DNA pada sel somatic dapat mengarah pada inisiasi keganasan.¹² Reaksi ROS terhadap lipid tidak jenuh membran sel dan plasma lipoprotein menyebabkan pembentukan lipid peroksida (malondialdehyde) yang secara kimia dapat memodifikasi protein dan basa asam nucleat. Selain itu ROS secara kimia juga dapat memodifikasi langsung asam amino dalam protein, sehingga tidak lagi dikenal sebagai milik sendiri (*self*) tetapi sebagai *nonself* oleh system immune.^{12,14} Antibody yang dihasilkan juga akan bereaksi silang dengan protein dari jaringan normal, sebagai awal dari munculnya berbagai penyakit autoimmune. Modifikasi kimia dalam protein dan lemak pada lipoprotein (LDL) menyebabkan LDL tidak lagi dapat dikenal oleh reseptor LDL liver, akibatnya LDL tidak dapat dibersihkan oleh liver. Sebaliknya, LDL akan diambil oleh reseptor makrofag, yang kemudian membuat macrofag mempunyai ukuran lebih besar dan menginfiltrasi lapisan pembuluh darah di bawah endothelium, terutama bila sudah terjadi kerusakan endothelium sebelumnya. Infiltrasi LDL tersebut kemudian ditutup oleh akumulasi kolesterol yang tidak teresterifikasi.^{3,12} Keadaan ini menyebabkan plaque aterosklerosis berkembang, sehingga pembuluh darah menjadi tersumbat. Selain itu kerusakan tyrosin residu dalam protein akibat ROS juga dapat mengarahkan pembentukan

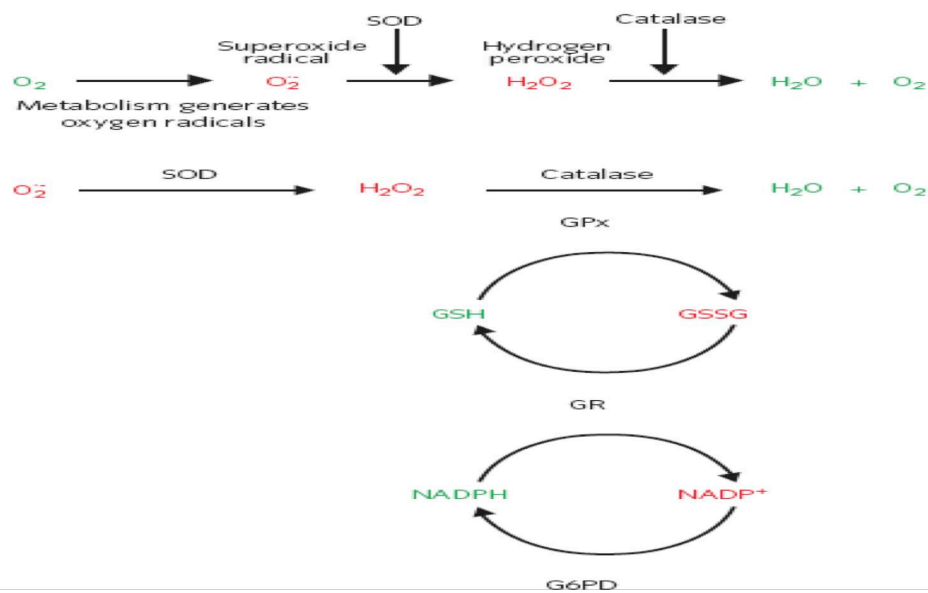
dihydroxyphenilalanin yang selanjutnya mampu bereaksi secara nonenzimatik untuk membentuk radikal bebas baru.¹²

Antioksidan Sebagai Penawar

Di dalam sistem biokimia terdapat keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan, sehingga jaringan tubuh terhindar dari kerusakan akibat ROS.^{9,15} Ketika terjadi peningkatan kadar ROS, tubuh akan merespon dengan memproduksi enzim CAT, HPx, dan SOD untuk menetralkan ROS. Namun demikian tetap ada sebagian ROS yang masih tersisa, terutama bila produksi ROS berlebihan. Untuk meredakan ROS yang masih tersisa perlu disediakan antioksidan tambahan seperti vitamin C, vitamin E, asam urat, polyfenol (flavonoid), dll untuk meminimalisir efek ROS tersebut.^{9,12,13,16}

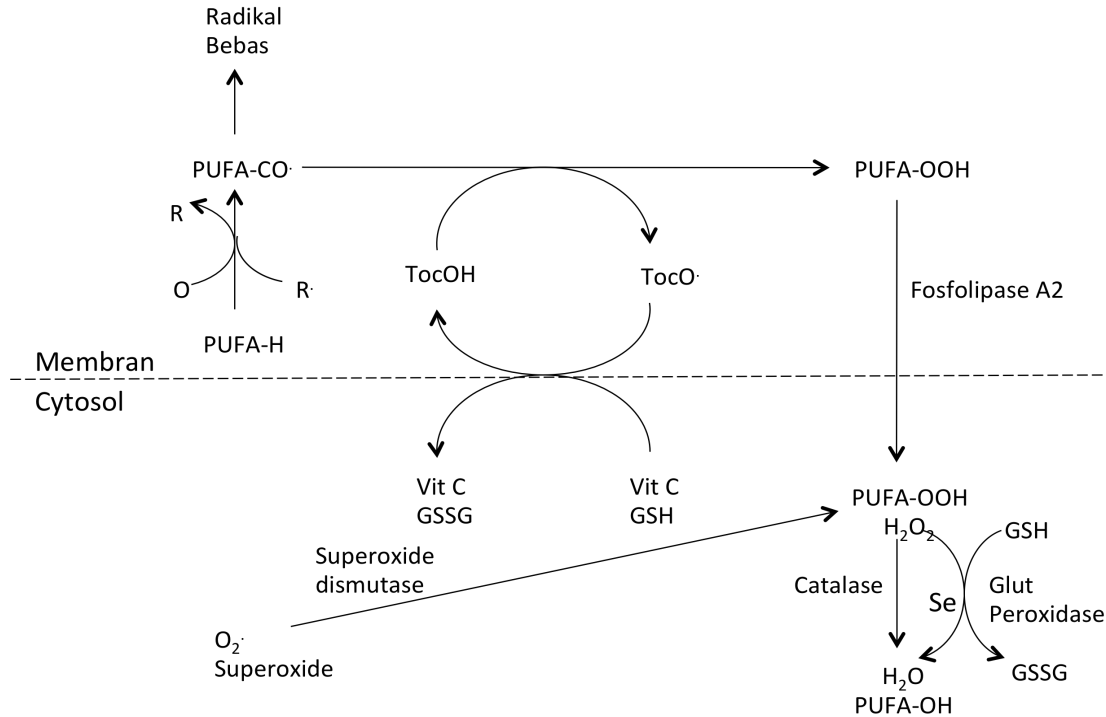
Sebagaimana disebutkan di atas Fe^{2+} dan Cu^+ adalah ion logam yang dalam keadaan tidak terikat dapat bereaksi dengan H_2O_2 membentuk radikal $\cdot OH$. Oleh karena tubuh mengontrol kadar ion logam tersebut dengan membentuk protein pengikatnya seperti transferin, ferritin, dan hemosiderin untuk mengikat Fe^{2+} , seruloplasmin untuk mengikat copper, dan metallothionein untuk mengikat ion logam yang lain.^{8,12} Selain bertindak sebagai pengontrol ion logam, protein tersebut juga sebagai gugus prostetik, transport, dan penyimpanan yang berukuran besar dan tidak larut air sehingga tidak terfiltrasi oleh ginjal, memungkinkan tubuh terhindar dari kekurangan ion.

Superoxida (O_2^-), radikal bebas yang dapat diproduksi secara accidental atau oleh reaksi yang dikatalisis oleh berbagai enzim akan dinetralkan atau dikonversi menjadi H_2O_2 oleh enzim SOD. H_2O_2 akan diubah menjadi H_2O dan O_2 oleh CAT. Oleh karena itu sebagian besar enzim yang memproduksi dan membutuhkan superoxide berada dalam peroxisome bersama dengan enzim SOD, CAT, dan HPx. Peroksida yang dibentuk oleh reaksi radikal OH dengan asam lemak tak jenuh pada membrane dan fosfolipid plasma akan direduksi menjadi asam lemak oleh glutathion peroksidase yang tergantung selenium (Se) sebagai cofactor. Oleh karena itu pemberian Se secara adequate akan mengoptimalkan aktivitas antioksidan. Glutathion yang teroksidasi akan direduksi oleh glutathion reductase yang tergantung NADPH. (gambar 3)¹³



Gambar 3. Reaksi pembentukan superoksida dan aktivitas enzim SOD

Peroxide lipid juga direduksi oleh vitamin E menjadi asam lemak, yang juga membentuk radikal tocoferol. Radikal tocoferol yang terbentuk relative stabil dan bertahan cukup lama sampai direduksi kembali oleh vitamin C pada permukaan sel atau lipoprotein. Sesudah bereaksi dengan radikal vitamin E, vitamin C menjadi radikal monodehydroascorbate, yang kemudian menjalani reduksi secara enzimatik oleh glutathion tereduksi (GSH) yang dikatalisis oleh glutathion peroksidase yang membutuhkan selenium menjadi vitamin C kembali dan glutathion teroksidasi (GSSG), atau nonenzimatik melalui reaksi dua molekul monodehydroascorbate membentuk satu molekul ascorbate dan dehydroascorbate yang keduanya bukan radikal. GSSG kemudian menjadi GSH kembali oleh pengaruh enzim glutathion reduktase. (gambar 4)^{12,17}



Gambar 4. Interaksi berbagai antioksidan pada fase lipid

Antioksidan lain seperti ubiquinon dan beta carotene adalah antioksidan larut lemak yang akan menangkap radikal pada membran sel dan plasma lipoprotein. Selain antioksidan larut lemak juga ada berbagai antioksidan yang larut air seperti ascorbat, asam urat, dan derivat polifenol yang berasal dari tanaman. Antioksidan tersebut bertindak sebagai antioksidan yang akan menangkap radikal larut air, kemudian membentuk radikal yang relative stabil dan dapat bertahan cukup lama sampai bereaksi dengan produk nonradikal. Berdasarkan pada aksi antioksidan tersebut maka mengkonsumsi antioksidan akan lebih baik bila diberikan tidak dalam bentuk tunggal, tetapi kombinasi.

Kesimpulan

Hewan tingkat tinggi yang hidup secara aerobik akan menghasilkan radikal bebas sebagai produk sampingan dari metabolisme tubuh. Sumber radikal bebas berasal dari berbagai reaksi oksidasi biologi, terutama yang berasal dari fosforilasi oksidatif dalam mitochondria. Bila produksi radikal bebas meningkat atau produk antioksidan rendah menyebabkan keseimbangan mengarah pada prooksidasi sehingga menimbulkan stress oksidatif. Untuk menetralkan radikal bebas tubuh menyediakan antioksidan baik yang enzimatik maupun nonenzimatik.

Kepustakaan

1. Guyton & Hall. Volume Paru. In: fisiologi Kedokteran. Ed 9th penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta 1996; 604
2. Botham KM, Mayes PA. Biologic Oxidation. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange 2009; 98 – 102
3. Turan B. Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2010; 11, 819-836
4. Botham KM, Mayes PA. The respiratory chain & Oxidative Phosphorilation. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange 2009; 103 – 12
5. Afanas'ev I. Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Skin Diseases. *Current Drug Metabolism* 2010; 11, 409 - 414
6. Rocha M, Mijares AH, Malpartida KG, et al. Mitochondria-Targeted Antioxidant Peptides *Current Pharmaceutical Design* 2010; 16, 3124-3131
7. Izyumov DS, Domnina LV, O. K. Nepryakhina OK, et al. Mitochondria as Source of Reactive Oxygen Species under Oxidative Stress. Study with Novel Mitochondria_Targeted Antioxidants – the "Skulachev_Ion" Derivatives. *Biochemistry (Moscow)*, 2010; 75, (2),123 – 129
8. Varh liou G, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 2010; 44(5): 479–496
9. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 357 – 67
10. Ladiges W, Wanagat J, Preston JB, et al. A Mitochondrial view of aging, reactive oxygen species and metastatic cancer. *Aging Cell* 2010; 9, 462 – 465
11. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353, 411–416.
12. Bender DA. Free Radicals an Antioxidant Nutrients. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange 2009;482 – 86
13. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology* 2009; 16: 449 – 57
14. Fuente MD, Miquel J. An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging:The Involvement of the Immune System in *Oxi-Inflamm-Agin*. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15, 3003-3026 3003
15. Rachman T. Peran ROS terhadap Fungsi Spermatozoa. *Journal Andrologi Indonesia* 2012;
16. Milczarek R, Hallmann A, Sokołowska E, et al. Melatonin enhances antioxidant action of a-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J Pineal Res* 2010; 49, 149 - 53
17. Agarawal A, Alamaneni SSR. Role of Free Radical in Female Reproductive Disease and Asisted Reproduction. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 9 (3): 338 – 3347