



## Bioaplikasi Kitosan dan Vitamin C terhadap Kadar Hemoglobin *Rattus norvegicus* yang Dipapar Pb Asetat

Eni Widya Ningsih✉, Aditya Marianti, Wiwi Isnaeni

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### Info Artikel

Diterima: 1 Maret 2021

Disetujui: 30 Maret 2021

Dipublikasikan: 15 April 2021

#### Keywords:

Chitosan; Pb acetate; blood Pb levels; blood Hb levels;

Vitamine C

Kitosan; Pb asetat; tingkat Pb darah; tingkat Hb darah;

Vitamin C.

### Abstrak

Akumulasi  $Pb^{2+}$  dalam darah dapat menghambat kerja enzim-enzim pensintesis hemoglobin (Hb). Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis apakah kombinasi kitosan dan vitamin C akan saling bersinergi mengurangi dampak negatif  $Pb^{2+}$  dalam tubuh, terutama terhadap kadar Hb. Penelitian ini menggunakan *Post Test Control Group Design*. Populasi penelitian adalah tikus jantan galur Wistar 30 ekor yang terbagi dalam enam kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (KK) diberi makan dan minum *ad libitum*, kontrol negatif (KN) hanya diberi Pb asetat 175 mg/kg BB, kontrol positif (KP) diberi Pb asetat 175 + kitosan 64 mg/kg BB, dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dipapar Pb asetat, kitosan, dan vitamin C dosis 100, 200, dan 300 mg/kg BB. Perlakuan dilakukan selama 42 hari. Darah tikus diambil pada hari ke-44 untuk diuji kadar Pb darahnya menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) dan kadar Hb dengan metode *Cyanmethemoglobin*. Hasil uji Anava menunjukkan terdapat penurunan kadar Pb darah dan kenaikan kadar Hb darah secara signifikan pada kelompok yang dipapar Pb asetat dan diberikan kitosan dan vitamin C. Hasil uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) menunjukkan bahwa kelompok KK, KP, P1, P2, P3 tidak berbeda secara signifikan, namun berbeda signifikan terhadap kelompok KN. Simpulan penelitian ini adalah kombinasi kitosan dan vitamin C saling bersinergi menurunkan kadar Pb darah tikus dan meningkatkan kadar Hb darah tikus yang dipapar Pb asetat.

### Abstract

Accumulation of  $Pb^{2+}$  in the blood inhibits various enzymes involved in heme synthesis pathway. This study aims to analyze the synergy potential of chitosan and vitamin C combination in depleting the detrimental effects exerted by  $Pb^{2+}$  exposure in the body, especially to blood Hb levels. This study use *Post Test Control Group Design*. The population of the study is male Wistar rats and a number of collected samples are 30 samples. The sample were divided into six group, the regular control (KK), that was fed and water *ad libitum*, the negative control (KN) was administrated only with Pb acetate at dose 175 mg/kg BB, positive control (KP) was administrated with Pb acetate + chitosan 64 mg/kg BB, and treatment group (P1, P2, P3) that was exposed by Pb acetate 175 mg/kg BB, chitosan 64 mg/kg BB, and vitamin C at dose of 100, 200, and 300 mg/kg BB. The treatment were administrated for 42 days. Blood was then collected on the 44<sup>th</sup> day to measure blood Pb level using *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) method, and to measure blood Hb using *Cyanmethemoglobin* method. The results of one way Anava showed a significant decrease in blood Pb level and increase in blood Hb level on groups exposed to Pb acetate and treated with combination of chitosan and vitamin C. The results of *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) showed that group of KK, KP, P1, P2, and P3 were not significantly different to one another, but significantly different to the KN group. The conclusion of this study is combination of chitosan and vitamin C is synergy to decrease further blood Pb level and increase blood Hb level in rats exposed with Pb acetate.

## PENDAHULUAN

Timbal (Pb) merupakan logam pencemar lingkungan dengan toksisitas tinggi yang dapat menyebabkan masalah kesehatan di banyak negara termasuk di Indonesia. Tingkat keberadaan Pb di lingkungan terus meningkat karena Pb digunakan dalam perindustrian. Pb ditemukan pada plastik, cat, keramik, kaca, pipa air, insektisida, dan campuran bahan bakar sebagai anti ketuk. Pemaparan Pb melalui minuman dapat berasal dari air minum yang dikonsumsi setiap hari, karena Pb juga digunakan pada pipa air, solder, dan kran air (Thurme *et al.*, 2002). Toksisitas Pb dapat mempengaruhi beberapa organ tubuh makhluk hidup dan berhubungan dengan sejumlah perubahan fisiologis, biokimia dan morfologi (Ibrahim *et al.*, 2012). Gejala keracunan Pb pada umumnya meliputi sakit kepala, *lead line* (garis Pb), nafsu makan berkurang, nyeri perut, kram dan sembelit (Elvida, 2013). Marianti *et al.* (2016) melaporkan bahwa 55 pekerja industri peleburan logam kuningan di kabupaten Pati Jawa Tengah yang telah bekerja minimal 2 tahun, 80% memiliki kadar Pb darah  $> 40 \mu\text{g/dl}$ . Sedangkan baku mutu yang ditetapkan *Centers for Disease and Prevention* (CDC) dari *The National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) pada tahun 2016 adalah  $10 \mu\text{g/dl}$ . Dalam kondisi paparan kronis,  $\text{Pb}^{2+}$  akan membentuk radikal bebas dalam tubuh serta menurunkan kemampuan antioksidasi, sehingga akan terjadi *stress oksidatif* yang menyebabkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) meningkat. Peningkatan ROS menurunkan kemampuan sistem antioksidan tubuh (Ostrovskaya *et al.*, 2011).

Sekitar 90%  $\text{Pb}^{2+}$  masuk ke dalam sirkulasi darah menuju eritrosit. Pada eritrosit,  $\text{Pb}^{2+}$  bersifat prooksidan sehingga akan mengakibatkan *stress oksidatif* yang dapat menimbulkan kerusakan membran eritrosit dan memperpendek umur eritrosit (Gugliotta *et al.*, 2012). Keracunan Pb dihasilkan dari interaksi  $\text{Pb}^{2+}$  dengan gugus sulfhidril dan ligan-ligan lain yang ada pada enzim-enzim dan makromolekul. Enzim yang memiliki gugus sulfhidril merupakan kelompok yang paling mudah terhalang kerjanya karena mudah berikatan dengan ion-ion logam berat yang masuk ke dalam tubuh sehingga mengakibatkan daya kerja yang dimiliki oleh enzim menjadi sangat berkurang atau sama sekali tidak bekerja. Keadaan seperti ini akan merusak sistem metabolisme tubuh. Akumulasi  $\text{Pb}^{2+}$  dalam aliran darah diserap dalam bentuk ikatan dengan eritrosit (Yulaipi & Aunurohim, 2013). Pengaruh  $\text{Pb}^{2+}$  dalam sistem hematopoetik adalah menghambat enzim yang terlibat dalam jalur sintesis heme yaitu enzim *aminolevulinic acid dehydratase* (ALAD), enzim yang mengkatalisis pembentukan *prophobilinogen* dari  $\delta$ -*aminolevulinic acid* (ALA), yang kedua adalah enzim *aminolevulinic acid synthetase* (ALAS), suatu enzim mitokondria yang mengkatalisis pembentukan *aminolevulinic acid* (ALA), dan enzim yang ketiga adalah enzim *ferrochelatase*, merupakan enzim mitokondria yang mengkatalisis penyisipan  $\text{Fe}^{2+}$  ke dalam *protoporphyrin* untuk membentuk heme (Flora *et al.*, 2012).

Akumulasi  $\text{Pb}^{2+}$  dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat diatasi oleh antioksidan. Peran antioksidan tersebut dimiliki oleh kitosan (Rajalakshmi *et al.*, 2013). Kitosan terdiri dari

tiga gugus fungsional reaktif, gugus amino, gugus hidroksil primer maupun sekunder. Gugus amino ( $\text{NH}_2$ ) dan gugus hidroksil ( $\text{OH}$ ) di dalam kitosan merupakan kunci gugus fungsional dalam aktivitas antioksidan pada kitosan. Interaksi logam dengan kitosan membentuk ikatan kompleks, dengan cara mengikat molekul, pertukaran ion, dan khelasi, sedangkan gugus amina dalam kitosan akan bereaksi dan mengikat  $\text{Pb}^{2+}$  dengan membentuk ikatan kovalen (El-fattah *et al.*, 2013). Namun demikian efek kitosan sebagai antioksidan & khelator  $\text{Pb}^{2+}$  belum sepenuhnya maksimal (Marianti *et al.*, 2017). Kemampuan kitosan sebagai khelator perlu diperkuat dengan senyawa yang sudah memiliki aktivitas antioksidan. Salah satu senyawa yang sering digunakan adalah vitamin C. Aktivitas vitamin C dapat meningkatkan fungsi imun, melindungi sel dari serangan radikal bebas (Winarsi, 2007).

Berdasarkan uraian di atas, dapat diketahui bahwa Pb memberikan efek negatif bagi tubuh, salah satunya pada sintesis hemoglobin. Pemberian kombinasi kitosan dan vitamin C diharapkan dapat mengurangi dampak yang ditimbulkan oleh  $\text{Pb}^{2+}$ . Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menganalisis apakah kombinasi pemberian kitosan yang berfungsi sebagai pengkelat Pb dan vitamin C yang berfungsi sebagai antioksidan akan saling bersinergi meningkatkan sifat antioksidasi dan mengurangi dampak negatif dari Pb dalam tubuh, terutama terhadap kadar Hb.

## METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan sampel 30 tikus jantan jenis galur Wistar umur 2 bulan. Tikus dibagi menjadi enam kelompok yakni kelompok kontrol (KK), kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP) dan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (P1, P2, P3). Tikus diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu sebelum diberikan perlakuan serta diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Pada hari ke-1 setelah adaptasi, hingga hari ke-42, untuk kelompok KK hanya diberi pakan dan minum saja, kelompok KN hanya diberikan Pb asetat dosis 175 mg/kg BB selama 42 hari secara per oral. Kelompok KP diberikan Pb asetat dan kitosan 64 mg/kg BB, untuk kelompok P1, P2, P3 diberikan Pb asetat, kitosan per oral dengan dosis 64 mg/kg BB dan vitamin C beturut-turut dengan dosis 100, 200, dan 300 mg/kg BB.

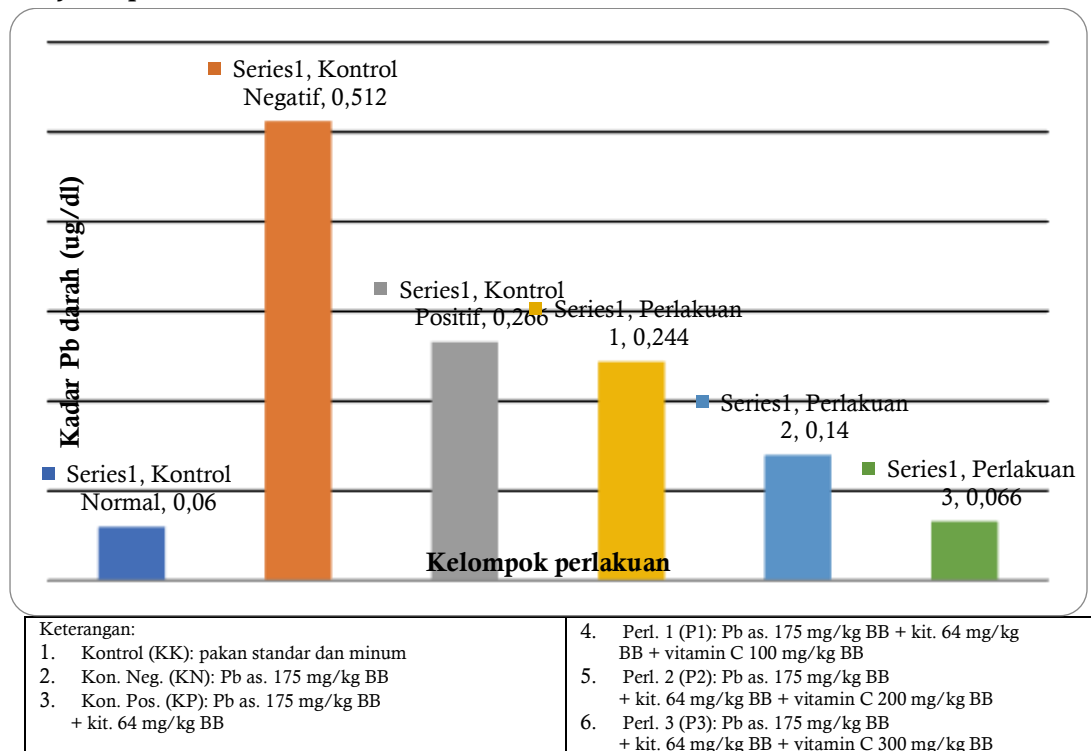
Pada hari ke-44, semua tikus diambil darahnya melalui sinus orbitalis mata dengan hematokrit. Darah ditampung di dalam tabung vacutainer yang sudah mengandung EDTA agar darah tidak mengalami koagulasi. Setelah itu darah diuji kadar Pb darah dengan metode *Atomic Absorbtion Spectrofotometer* (AAS) dan diuji kadar hemoglobin dengan metode *Cyanmethemoglobin*.

Analisis data dari kadar Pb darah dan kadar Hb darah dilakukan uji statistik dengan *one away Anava*. Hasil uji Anava berpengaruh signifikan, dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Analisis data diolah dengan program komputer *SPSS release 16.0*

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar Pb darah

Pemaparan senyawa Pb asetat selama 42 hari menyebabkan terjadinya kenaikan kadar Pb dalam darah karena terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Hasil uji kadar Pb darah disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil Uji Kadar Pb Darah Tikus yang Dipapar Pb Asetat

Pada Gambar 1 dapat diketahui bahwa kadar Pb tertinggi pada tikus kelompok KN dan terendah ditemukan pada KK. Hasil analisis normalitas dan homogenitas data penelitian menunjukkan bahwa data kadar Pb darah terdistribusi normal dan homogen. Karena data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis statistik one way Anava. Hasil uji one way Anava menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dibuktikan dengan perolehan nilai F sebesar 3.876 dengan nilai signifikan  $0,010 < 0,05$ . Karena hasil Anava terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji lanjut dengan menggunakan Duncan Multiple Range Test (DMRT). Hasil uji lanjut DMRT dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil DMRT Kadar Pb Darah Tikus yang Dipapar Pb Asetat

Kelompok	Kadar Pb darah (Rerata $\pm$ SD)	Keterangan
KK	0,0600 $\pm$ 0,0894 <sup>a</sup>	Kontrol biasa
KP	0,2660 $\pm$ 0,2899 <sup>a</sup>	Pb asetat + kitosan
P1	0,2440 $\pm$ 0,2546 <sup>a</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 100
P2	0,1400 $\pm$ 0,1649 <sup>a</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 200
P3	0,0660 $\pm$ 0,1028 <sup>a</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 300
KN	0,5120 $\pm$ 0,1655 <sup>b</sup>	Pb asetat

Keterangan: perbedaan huruf pada hasil rata-rata menunjukkan perbedaan yang signifikan

Hasil uji DMRT pada **Tabel 1** menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kelompok KK, kecuali kelompok KN. Kelompok KN adalah kelompok yang hanya diberi Pb asetat tanpa diberi senyawa pengkhelat kitosan dan vitamin C, berbeda signifikan dengan kelima kelompok yang lain (KK, KP, P1, P2, dan P3), sedangkan kelima kelompok tersebut tidak berbeda signifikan satu sama lain. Pada kelompok KN, kadar Pb darahnya menunjukkan rerata yang paling tinggi yaitu 0,5120 mg/kg dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, yang berarti setiap kilogram tikus terdapat akumulasi Pb sekitar 0,512 mg. Sedangkan P1, P2, dan P3 tidak berbeda nyata dengan kelompok KK dan KP. Hal tersebut membuktikan bahwa kombinasi kitosan dan vitamin C dapat digunakan sebagai alternatif dalam menurunkan kadar Pb darah. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan memiliki kemampuan untuk dijadikan sebagai pengkhelat Pb darah, dan vitamin C sebagai antioksidan yang bekerja dengan cara mendonorkan elektron ke senyawa logam.

Pb asetat yang diinduksikan secara oral akan memasuki sistem pencernaan, 95% Pb didistribusikan ke dalam darah dan terikat pada eritrosit (Yulaipi & Aunurohim, 2013). Kemampuan Pb dalam menggantikan tempat kation bivalen seperti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , dan kation monovalen yang secara langsung dapat mengganggu metabolisme biologis dari sel. Aktivitas bivalensi  $\text{Pb}^{2+}$  yang menyerupai  $\text{Fe}^{2+}$  bekerja dengan cara menghambat (Yulaipi and Aunurohim, 2013), aktivitas inilah yang menyebabkan ion Pb berikatan dengan eritrosit, karena  $\text{Fe}^{2+}$  adalah ion yang dibutuhkan dalam pembentukan hemoglobin yang merupakan protein penting dalam darah. Ekskresi Pb berjalan sangat lambat, waktu paruh Pb di dalam darah kurang lebih 25 hari, pada jaringan lunak 40 hari, sedangkan pada tulang 25 tahun (Yulaipi & Aunurohim, 2013). Ekskresi yang lambat inilah yang menyebabkan mudah terakumulasinya Pb didalam tubuh. Selain itu, Pb di dalam tubuh menyebabkan peningkatan ROS serta secara langsung menekan sistem antioksidan tubuh dan menimbulkan peroksidasi lipid. Aktivitas ROS dapat menyebabkan kerusakan pada banyak molekul di dalam sel.

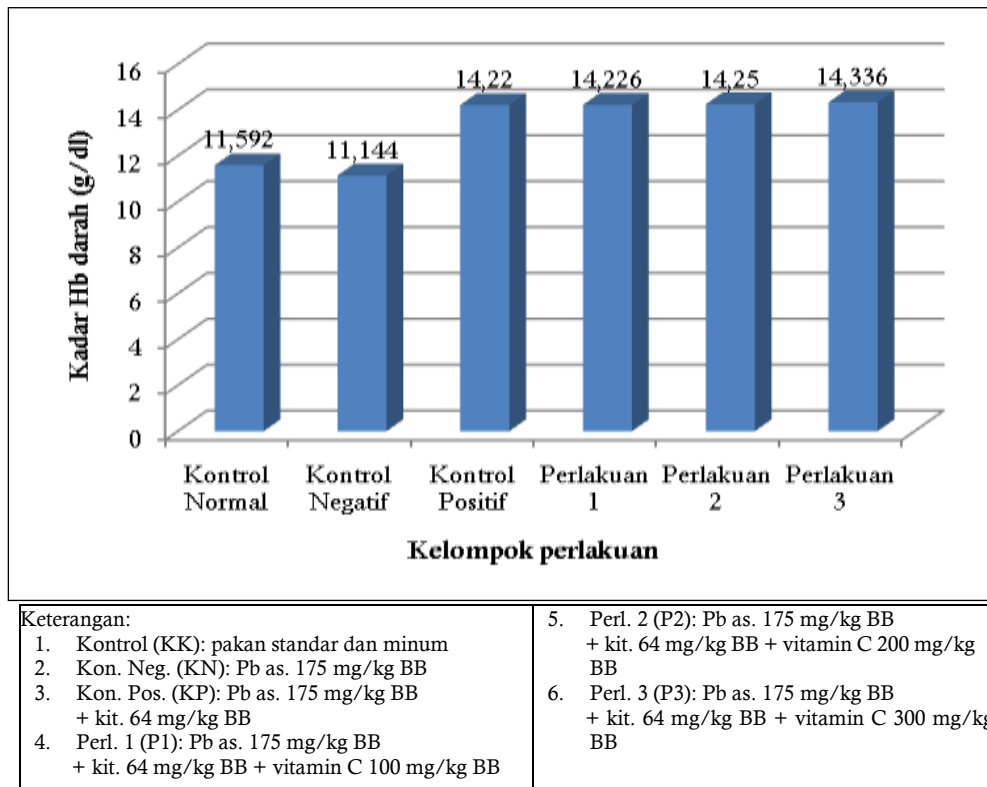
Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa kelompok KK, KP, P1, P2, P3 tidak berbeda secara signifikan, artinya pada kelompok ini memiliki rata-rata kadar Pb darah yang hampir sama. Hasil analisis P1, P2, dan P3 menunjukkan kadar Pb darah lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok KP dan kadar Pb paling rendah dihasilkan oleh kelompok P3 yaitu sebesar 0,066 mg/kg hampir sama dengan kelompok KK yaitu sebesar 0,06 mg/kg. Hasil ini dapat dimaknai bahwa kombinasi kitosan dan vitamin C memiliki kemampuan mengkhelat  $\text{Pb}^{2+}$  darah yang lebih baik jika dibandingkan dengan hanya menggunakan kitosan saja. Penelitian yang dilakukan oleh Marianti *et al.* (2016) menunjukkan bahwa daya khelasi kitosan mampu mengkhelat  $\text{Pb}^{2+}$  setara dengan EDTA. Kitosan memiliki reaktivitas yang tinggi dan menyebabkan sifat polielektrolit kation sehingga dapat berperan sebagai penukar ion dan dapat berperan sebagai adsorben logam berat (Aldiya *et al.*, 2016). Struktur kitosan dengan enam gugus fungsional yaitu gugus hidroksil

yang bersifat hidrofilik dan gugus amina berfungsi sebagai tempat pengkhelat untuk  $Pb^{2+}$  (Elvida, 2013). Pengikatan ion logam oleh kitosan terjadi melalui dua cara, yaitu pertukaran ion dan pengkhelatan. Pertukaran ion terjadi melalui pertukaran proton pada kitosan dengan kation logam. Pada pengkhelatan, reaksi yang terjadi ialah pembentukan senyawa kompleks antara kitosan dan ion logam. Kitosan berperan sebagai ligan dan ion logam sebagai pusatnya. Gugus karboksil yang terdapat pada kitosan dapat meningkatkan kehidrofilan khelat, sehingga ekskresi kedalam urin juga ditingkatkan dan detoksifikasi meningkat.

Hasil data perlakuan dengan tambahan vitamin C yaitu pada P1, P2, P3, menunjukkan adanya pengaruh vitamin C yang ditambahkan. Vitamin C memutus reaksi radikal bebas yang dihasilkan melalui lipid peroksidasi. Seperti yang diketahui, bahwa  $Pb^{2+}$  menyebabkan peningkatan ROS yang secara langsung menekan antioksidan tubuh dan menimbulkan peroksidasi lipid. Vitamin C merupakan agen pereduksi yang mampu mereduksi senyawa oksidan seperti  $H_2O_2$ , RO-, NO-, ONOO, OH- serta oksidan lain. Peningkatan jumlah radikal bebas yang terjadi secara terus menerus meningkatkan pemakaian enzim antioksidan intraseluler (Ball, 2003). Adanya peningkatan antioksidan di dalam tubuh karena suplementasi vitamin C pada P1, P2, dan P3 menurunkan kadar radikal bebas sehingga secara tidak langsung peroksidasi lipid menurun dan kadar Pb darah menurun.

#### Kadar Hb darah

Pemaparan senyawa Pb asetat selama 42 hari menyebabkan penurunan kadar Hb darah pada kelompok KN karena terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Hasil uji kadar Hb darah disajikan pada **Gambar 2**.



**Gambar 2.** Hasil Kadar Hb Darah Tikus yang Dipapar Pb Asetat

Dari data pada **Gambar 2** dapat diketahui bahwa kadar Hb tertinggi pada tikus kelompok KK dan terendah ditemukan pada kelompok KN. Hasil analisis normalitas dan homogenitas data penelitian menunjukkan bahwa data kadar Hb darah terdistribusi normal dan homogen. Karena data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis statistik *one way Anava*. Hasil uji *one way Anava* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar perlakuan dibuktikan dengan perolehan nilai F sebesar 68.028 dengan nilai signifikan  $0,000 < 0,05$ . karena hasil Anava terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Hasil uji lanjut DMRT dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2.** Hasil DMRT Kadar Hb Darah Tikus yang Dipapar Pb Asetat

Kelompok	Kadar Hb darah (Rerata $\pm$ SD)	Keterangan
KN	11.1440 $\pm$ 0, 40022 <sup>a</sup>	Pb asetat
KP	14.2200 $\pm$ 0, 16447 <sup>b</sup>	Pb asetat + kitosan
P1	14.2260 $\pm$ 0, 03715 <sup>b</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 100
P2	14.2500 $\pm$ 0, 61465 <sup>b</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 200
P3	14.3360 $\pm$ 0, 15339 <sup>b</sup>	Pb asetat + kitosan + vit C 300
KK	14,5920 $\pm$ 0, 40289 <sup>b</sup>	Kontrol biasa

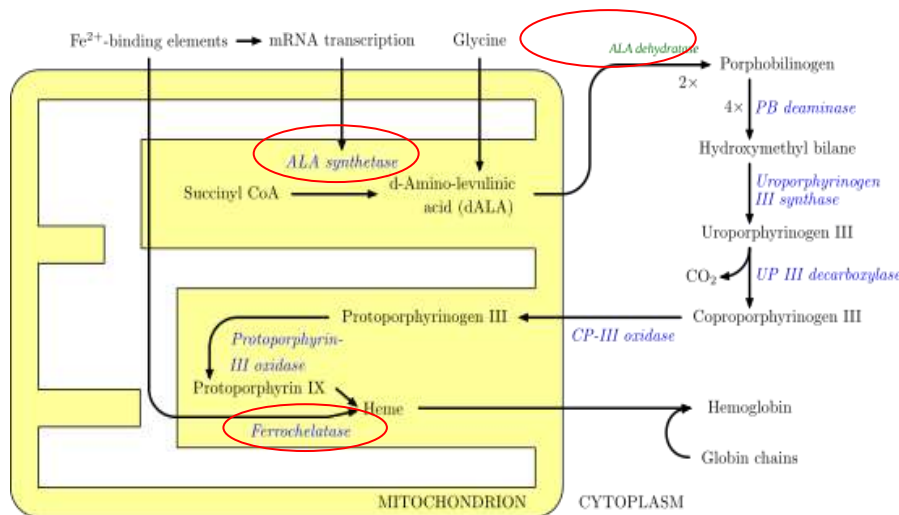
Keterangan: perbedaan huruf pada hasil rata-rata menunjukkan perbedaan yang signifikan

Dari **Tabel 2** dapat diketahui bahwa kadar Hb pada kelompok KN berbeda signifikan dengan kelima kelompok lainnya (KK, KP, P1, P2, dan P3). Namun kelima kelompok tersebut tidak berbeda signifikan satu sama lain. Pada kelompok KN, kadar Hb darahnya menunjukkan rerata yang paling rendah yaitu 11.1440 g/dL dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sedangkan kelompok KP tidak berbeda signifikan dengan kelompok KK, P1, P2, dan P3. Hal tersebut membuktikan bahwa kombinasi kitosan dan vitamin C dapat digunakan sebagai alternatif dalam menaikkan kadar Hb darah yang dipapar Pb asetat. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan memiliki kemampuan untuk dijadikan sebagai pengkhelet Pb darah, dan vitamin C sebagai antioksidan yang bekerja mendonorkan elektron ke senyawa logam, menjadikan kadar Pb darah berkurang, dan mengurangi penghambatan sintesis Hb sehingga Hb meningkat.

Biosintesis heme yaitu porfirin berasal dari derivat Ko-enzim A dari asam suksinat pada siklus Kerbs dalam mitokondria dan asam amino glisin. Hasil reaksi kondensasi antara suksinil Ko-enzim A dan glisin adalah asam alfa amino beta keto adipat yang dengan cepat dikarboksilasi menjadi asam  $\delta$ -aminolevulenat. Sintesis asam  $\delta$ -aminolevulenat terjadi di mitokondria. Dalam sitoplasma dua molekul  $\delta$ -aminolevulenat dikatalisis oleh enzim  *$\delta$ -aminolevulinic acid dehydrogenase* membentuk dua molekul air dan satu molekul *porphobilinogen*. Dalam sitoplasma empat unit *porphobilinogen* mengalami kondensasi membentuk polimer siklik yaitu *uroporphobilinogen*. Ada dua isomer *uroporphobilinogen*, yaitu isomer tipe I dan isomer tipe III. Heme berasal dari isomer tipe III. *uroporphobilinogen III* diubah menjadi *coproporphyrinogen III*. Reaksi ini dikatalisis oleh



*uroporphobilinogen decarboxylase*. Kemudian *coproporphyrinogen III* memasuki mitokondria, selanjutnya diubah menjadi *protoporphyrinogen*. Dari 15 kemungkinan isomer hanya satu yang dibentuk, yaitu *protoporphyrinogen III*. *Protoporphyrinogen III* dioksidasi oleh *protoporphyrin III oxidase* menghasilkan *protoporphyrin IX*. Tahap akhir pembentukan heme adalah pemasukan ion ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ke dalam *protoporphyrin IX* yang dikatalisis oleh enzim *ferrochelatase*. Sintesis heme dapat dijelaskan dengan skema berikut.



**Gambar 3.** Sintesis hemoglobin (Kim *et al.*, 2015)

Senyawa Pb yang masuk kedalam tubuh terdegradasi melepaskan  $\text{Pb}^{2+}$  yang bersifat menghambat kerja enzim proteolitik yang mengakibatkan cedera sel. Secara signifikan  $\text{Pb}^{2+}$  mempengaruhi jalan sintesis heme, tiga enzim yang terlibat dalam sintesis heme adalah  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrogenase (ALAD), enzim *aminolevulinic acid synthetase* (ALAS), dan enzim *ferrochelatase* yang mengakibatkan tidak terbentuknya molekul *porphobilinogen*, *uroporphobilinogen III*, *coproporphyrinogen III*, *protoporphyrinogen III*, dan *protoporphyrin IX* sehingga tidak terbentuk porfirin. Pada porfirin yang seharusnya terbentuk nantinya akan mendapat pemasukan ion ferro yang dikatalisis oleh enzim *ferrochelatase*, namun dengan adanya Pb asetat maka kerja enzim *ferrochelatase* pun juga terhambat sehingga biosintesis heme tidak terbentuk (Flora *et al.*, 2012). Penghambatan  $\text{Pb}^{2+}$  terhadap ketiga enzim tersebut dikarenakan enzim-enzim tersebut termasuk kelompok enzim sulfhidril, dimana Pb adalah logam yang bersifat elektropositif terhadap enzim sulfhidril dengan afinitas yang tinggi.

Pemberian kitosan pada kelompok KP meningkatkan kadar Hb darah tikus yang dipapar Pb asetat. Kemampuan kitosan yang diperkuat dengan vitamin C pada P1, P2, dan P3 meningkatkan antioksidan pada tikus, sehingga fungsi imun dalam melindungi sel dari radikal bebas juga meningkat. Sifat kitosan yang dapat mengikat logam berat reaktif, menjadikan kitosan memiliki kemampuan sebagai antioksidan dengan menghambat produksi ROS dan mencegah oksidasi lipid (Rajalakshmi *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan vitamin C dapat langsung bereaksi dengan anion superoksida, radikal hidroksil, oksigen single dan lipid peroksida. Sebagai reduktor asam askorbat



akan mendonorkan satu elektron membentuk semi dehidroaskorbat yang tidak bersifat reaktif dan selanjutnya mengalami reaksi disproporsionasi membentuk dehidroaskorbat yang bersifat tidak stabil. Dehidroaskorbat akan terdegradasi membentuk asam oksalat dan asam treonat. Vitamin C menjaga ion Fe terikat dari beberapa enzim hidroksilase, membantu penyerapan zat besi dengan membentuk kompleks besi askorbat larut. Oleh karena kemampuan vitamin C sebagai penghambat radikal bebas, maka peranannya sangat penting dalam menjaga integritas sel.

Kitosan dan vitamin C bekerja secara sinergi mengikat  $Pb^{2+}$  yang terikat dalam darah. Struktur hidroksil kitosan berperan sebagai antioksidan yang secara sinergi bekerjasama dengan vitamin C yang merupakan antioksidan yang sengaja ditambahkan. Vitamin C menerima atau mendonorkan elektron untuk menghilangkan kondisi elektron tidak berpasangan yang ada pada radikal bebas, sehingga ikatan antara  $Pb^{2+}$  dan gugus sulfhidril enzim dapat terputus. Kitosan mengkhelat  $Pb^{2+}$  dalam tubuh dengan cara pengikatan ion dan pembentukan senyawa kompleks,  $Pb^{2+}$  yang tidak terkhelat atau belum sempat terkhelat oleh kitosan akan diikat oleh vitamin C, begitupun sebaliknya, sehingga  $Pb^{2+}$  dalam tubuh akan tereliminasi lebih banyak.

## SIMPULAN

Dari uraian hasil dan pembahasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa kombinasi kitosan dan vitamin C saling sinergi menurunkan kadar Pb darah tikus yang dipapar Pb asetat dan berpengaruh meningkatkan kadar Hb tikus yang dipapar Pb asetat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aldiya, M.J., Yulianti, A.A., & Kamil, K.A. 2016. Pengaruh pemberian kitosan terhadap kandungan plumbum (Pb) darah dan hati puyuh (*Coturnix-coturnix japonica*). Skripsi, Universitas Padjajaran.
- Ball G.F.M. (2003). *Encyclopedia of food science and nutrition* (2<sup>nd</sup> ed) (324-332). Elsevier.
- El-fattah, H.M.A., M, A.-K.Z., A, H.E., El-rahman, M.K.A. & Hassan, L.E. (2013). Chitosan as a hepato-protective agent against single oral dose of dioxin. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol*, 7(3), 11–17.
- Elvida. (2013). Pengaruh kitosan terhadap komponen darah, kadar hemoglobin, sgpt dan sgot pada tikus (*Rattus norvegicus* L) yang dipapar plumbum asetat. Tesis, Universitas Sumatera Utara.
- Flora, G., Gupta, D. & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A Review with Recent Updates. *Interdis Toxicol*, 5(2), 47–58.
- Gugliotta, T., De-Luca, G., Romano, P., Rigano, C., Scuteri, A. & Romano, L. (2012). Effects of lead chloride on human erythrocyte membranes and on kinetic anion sulphate and glutathione concentrations. *CMBL*, 17(4), 586–597.
- Ibrahim, N.M., Eweis, E.A., El-Beltagi, H.S. & Abdel-Mobdy, Y.E. (2012). Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pacific J Tropic Biomed*, 2(1), 41–46.
- Kim, H.R., Stephanie J.W., Claire F., Min-Gu K., Michael S., & Myung G.S. (2015). Mitochondrial DNA aberrtion and pathophysiological implication in hematopoetic disease, chronic inflammatory disease, and cancers. *Ann Lab Med*, 35, 1-14.
- Marianti, A., Anatasara, D. & Ashar, F.F. (2017). Chitosan as chelating and protective agents from lead intoxication in rat. *Biosaintifika*, 9(1), 126–133.
- Marianti, A., Anies, A. & Abdurachim, H.R.S. (2016). Causality pattern of the blood lead, monoamine oxidase A, and serotonin levels in brass home industry workers chronically exposed to lead. *Songklanakarin J Sci Technol*, 38(2), 147–153.
- Ostrovskaya S.S., Shatornaya V.F. & Kolosova I. (2011). Combined impact of plumbum and cadmium on the organism. *Foreigning Literature Review*, 2(1), 99-101.
- Rajalakshmi, A., Krithiga, N. & Jayachitra, A. (2013). antioxidant activity of the chitosan extracted from shrimp exoskeleton. *Middle-East J Sci Re*, 16(10), 1446-1451.

- Winarsi. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yulaipi, S. & Aunurohim. (2013). Bioakumulasi logam berat timbal (Pb) dan hubungannya dengan laju pertumbuhan ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Sains dan Seni Pomits*, 2(2), 2337–3520.