

## Efektivitas Kitosan Terhadap Kadar Feritin Darah Dan Kadar Besi Hati Tikus Putih Wistar Jantan *Iron Overload Model*

Sonata Daniatiek<sup>1</sup>, M.T. Kamaluddin<sup>2</sup>, Theodorus<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang

### ABSTRAK

Penelitian terdahulu telah membuktikan penggunaan kitosan sebagai absorben logam berat seperti Zn, Mg, Cd, Cr, Fe dan Cu. Kitosan Hasil penelitian dari Seo *et al.* (1) menggunakan kitosan yang larut dalam air (kitosan dengan BM lebih rendah) untuk menyerap berbagai ion logam. Peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh kitosan sebagai chelating agent dalam menurunkan kadar feritin serum dan kadar besi hati pada tikus wistar model iron overload dengan membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok pemberian deferiprone. Penelitian ini eksperimental laboratorium *in vivo*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dibagi menjadi enam kelompok. Kelompok normal (N) yang tidak mendapat perlakuan, kelompok kontrol negatif (K-), yaitu kelompok yang mendapatkan induksi berupa iron sucrose 75 mg/kgBB selama lima minggu (tiga kali seminggu), kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) yang telah mendapatkan induksi iron sukrose dan diberikan kitosan dengan dosis 16 mg/kgBB, 32 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB dan kelompok kontrol positif (K+) yang mendapatkan induksi iron sukrose dan obat deferiprone (DFP) 75 mg/kgBB. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, dapat disimpulkan terdapat peningkatan kadar feritin serum dan kadar besi hati kelompok induksi dengan iron sukrose 75 mg/kgBB selama lima minggu dibandingkan dengan kelompok normal. Secara klinis, pemberian kitosan dosis 16 mg/kgBB lebih efektif menurunkan kadar feritin serum dibandingkan dengan pemberian kitosan dosis 32 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB. Sedangkan kitosan dosis 64 mg/kgBB lebih efektif menurunkan kadar besi hati dibandingkan dengan pemberian kitosan dosis 16 mg/kgBB dan 32 mg/kgBB. Pemberian kitosan 16 mg/kgBB setara dengan pemberian deferiprone 75 mg/kgBB dalam menurunkan kadar feritin serum dan kitosan 64 mg/kgBB setara dengan deferiprone 75 mg/kgBB dalam menurunkan kadar besi hati.

Kata kunci : Kitosan, feritin serum, besi hati, iron sukrose, deferiprone

### ABSTRACT

*There was a research it is prove it that used chitosan as absorbansi heavy metal like Zn, Mg, Cd, Fe and Cu. The resume of the research of chitosan from Seo et al. (1) it is using chitosan in the liquid on the water (chitosan with low BM) for the absorb of the many kinds metal ion. The research was very interesting for know more of the influence chitosan as chelating agent in the lower of level feritin serum and liver iron level of male wistar white rats in Iron Overload Model compare with other groups and the groups was give deferiprone. The research was laboratorium experimental in vivo. The sample is using in the research in 30 white male rats (Rattus Norvegicus) galur wistar who shared in the six groups. In the normal group (N) which not giving a treatment. Negative group (K-) which get the induction with iron sucrose 75 mg/kgBB for five weeks (three times a week), treatment groups (P1,P2 and P3) it is get the induction iron sucrose and give chitosan 16 mg/kgBB, 32 mg/kgBB and 64 mg/kgBB and the positive groups (K+) that get a induction with iron sucrose 75 mg/kgBB and deferiprone (DFP) 75mg/kgBB. Clinically, the administration of chitosan of chitosan dose of 16 mg/kgBB was more effective in reducing serum feritin levels compared with the dosage of 32 mg/kgBB and 64 mg/kgBB. While chitosan dose 64 mg/kgBB more effectively lower liver iron levels compared with the dose 16 mg/kgBB dan 32 mg/kgBB. Giving chitosan 16 mg/kgBB is equivalent to deferiprone 75 mg/kgBB in lowering serum feritin and chitosan 64 mg/kgBB equivalent to deferiprone 75 mg/kgBB in decreasing liver iron content.*

Keyword : Chitosan, Feritin serum, liver iron, iron sucrose, deferiprone

## PENDAHULUAN

Zat besi merupakan molekul penting bagi makhluk hidup, karena berperan dalam berbagai nutrisi terkait metabolik antara lain pengangkutan oksigen, penghasilan tenaga oksidatif, pernapasan mitokondria dan pembentukan DNA (2). Zat besi diperoleh dari makanan sekitar 1–2 mg/hari dan dalam keadaan normal seimbang dengan pembuangannya melalui pengelupasan sel epitel dan perdarahan (3).

Penimbunan besi dapat menyebabkan disfungsi berbagai organ tubuh akibat terjadinya peningkatan absorpsi besi dan transfusi darah berulang. Hati merupakan salah satu organ yang terganggu akibat penumpukan besi (4). Transferin plasma akan menjadi jenuh dengan besi ketika terjadi penimbunan besi yang kronis sehingga sejumlah besi tidak diikat oleh transferin (*non transferin bound iron*). *Non-transferin bound iron* (NTBI) ini selanjutnya mengalami ambilan (*uptake*) yang cepat oleh hati berkisar 70% (5).

Pada penderita thalasemia penimbunan besi dalam tubuh, tidak hanya disebabkan oleh transfusi darah berulang tapi juga akibat bertambahnya absorpsi besi dari makanan karena adanya peningkatan proses eritropoiesis yang tidak efektif. Manusia tidak memiliki mekanisme untuk mengekskresi kelebihan besi, sehingga diperlukan terapi kelasi. Terapi kelasi besi terbukti sangat efektif menurunkan kandungan besi pada penderita thalassemia yang mendapat transfusi. Sampai saat ini sudah ada 3 macam kelasi besi dipasaran yaitu *Desferoxamin* (*Desferal*, *DFO*), *Deferiprone* (*Perrifrox*, *DFP*) dan *Deferasirox*

(*Exjade*). Ketiga kelasi besi ini berharga mahal (6).

Penelitian terdahulu telah membuktikan penggunaan kitosan sebagai absorben logam berat seperti Zn, Mg, Cd, Cr, Fe dan Cu. Kitosan Hasil penelitian dari Seo *et al.* (1) menggunakan kitosan yang larut dalam air (kitosan dengan BM lebih rendah) untuk menyerap berbagai ion logam. Hasilnya ion – ion logam berat seperti Cr, Fe, dan Cu telah berhasil diserap oleh kitosan yang larut dalam air tersebut. Situs aktif kitosan baik dalam bentuk  $\text{NH}_2$  ataupun dalam keadaan terprotonasi  $\text{NH}_3^+$  mampu mengadsorpsi logam-logam berat melalui mekanisme pembentukan khelat atau penukar ion (7). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek kitosan dalam menurunkan kadar feritin darah dan menurunkan kadar besi hati pada tikus wistar kelebihan zat besi. Penggunaan kitosan sebagai *antichelating* secara *in vivo* akan diuji dengan melihat pengaruh pemberian kitosan terhadap penurunan kadar feritin darah dan kadar besi hati pada tikus putih wistar jantan *Iron Overload Model*.

## METODE

Tikus percobaan akan ditimbang berat badannya kemudian setelah induksi dan perlakuan dilakukan pengukuran kadar feritin darah menggunakan metoda Elissa dan kadar besi hati menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom. Tikus 30 ekor di aklimatisasi selama satu minggu, dan dibagi secara acak kedalam enam kelompok perlakuan. Pada hari ke-7 tikus diukur berat badannya. Kelompok kontrol (K) hanya mendapatkan makanan standar dan diberikan makan dan minum *ad libitum*. Kelompok kontrol negatif (K-), P1, P2,

P3, dan kontrol positif (K+) diinduksi dengan cara disuntikkan iron sukrose secara intraperitoneal dengan dosis 75 mg/kgBB, tiga dosis per minggu, selama lima minggu. Pada akhir induksi, tikus ditimbang berat badannya. Setelah induksi, kelompok K- diterminasi dengan ketamin 75 mg/kgBB. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbitalis sebanyak 1,5 cc dengan pipet mikrohematokrit dan disimpan dalam tabung EDTA dan akan diperiksa kadar feritin serumnya dengan Elisa kit. Kemudian, dibelah perutnya untuk diambil hatinya. Organ hati akan dicuci dengan PBS 1% dan ditimbang beratnya. Hatinya akan didestruksi dan diperiksa kadar zat besi dengan AAS. Setelah induksi, kelompok perlakuan diberikan kitosan dengan dosis P1 16mg/kgBB/hari, P2 32mg/kgBB/hari, dan P3 64 mg/kgBB/hari. kitosan diberikan seraca oral dengan spuit yang dilengkapi jarum oral selama empat minggu. Selama perlakuan, tikus tetap diberikan makan dan minum *ad libitum*. Setelah induksi, kelompok K+ diberikan *deferiprone* dengan dosis 75 mg/kgBB secara oral dengan spuit yang dilengkapi jarum oral selama empat minggu. Selama perlakuan, tikus tetap diberikan makan dan minum *ad libitum*. Diakhir perlakuan, kelompok P1, P2, P3, K+ diukur berat badannya. Kemudian diterminasi dengan ketamin 75 mg/kgBB. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbitalis sebanyak 1,5 cc dengan pipet mikrohematokrit dan disimpan dalam tabung EDTA dan akan diperiksa kadar feritin serumnya dengan Elisa kit. Kemudian, dibelah perutnya untuk diambil hatinya. Organ hati akan dicuci dengan PBS

1% dan ditimbang beratnya. Hati akan didestruksi dan diperiksa kadar zat besi dengan AAS.

## HASIL

### Uji Homogenitas Berat Badan Tikus

Penelitian ini dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui berat badan tikus sebelum perlakuan memiliki homogenitas data yang sama. Hasil uji statistik dengan menggunakan uji statistik *levene test* didapatkan berat badan tikus nilai  $p = 0,757$  ( $p > \alpha$ ), hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan rerata berat badan tikus sebelum perlakuan antar kelompok perlakuan sehingga dapat disimpulkan bahwa berat badan tikus memiliki varian data yang homogen, sehingga persyaratan eksperimental terpenuhi.

Tabel 1. Uji Homogenitas Berat Badan Tikus

Kelompok Perlakuan	N	$\bar{x} \pm SD$	
		Berat Badan Tikus (gram)	<i>p value</i>
Dosis 16 mg/kgbb	5	188,98 ± 5,597	0,757
Dosis 32 mg/kgbb	5	190,24 ± 4,73	
Dosis 64 mg/kgbb	5	191,14 ± 3,60	
Kontrol Positif	5	190,38 ± 2,83	
Kontrol negatif	5	190,30 ± 3,60	

*Shapiro wilk p = 0,05; Uji Levene Test p = 0,05*

### Uji Normalitas

Dari uji tersebut didapatkan kadar feritin darah dan kadar besi hati sebelum terdistribusi normal ( $p > \alpha$ ) dengan nilai  $\alpha = 0,05$  (5%).

Tabel 2. Uji Normalitas

Variebel	Kelompok Perlakuan	N	p value (Pre)
Kadar Feritin Darah	Dosis 16 mg/kgbb	5	0,932
	Dosis 32 mg/kgbb	5	0,932
	Dosis 64 mg/kgbb	5	0,932
	Kontrol Positif	5	0,932
	Kontrol Negatif	5	0,932
Kadar besi Hati	Dosis 16 mg/kgbb	5	0,356
	Dosis 32 mg/kgbb	5	0,356
	Dosis 64 mg/kgbb	5	0,356
	Kontrol Positif	5	0,356
	Kontrol Negatif	5	0,356

Uji Shapiro Wilk p = 0,05

#### Efektivitas kadar feritin darah

Pada penelitian ini mengetahui efektivitas kadar feritin darah antar kelompok. Tabel 4.3.1 Menunjukkan hasil uji statistik dengan menggunakan *uji paired t-test* didapatkan rerata kadar feritin darah pada kitosan dosis 16 mg/kgBB dan kontrol positif sebelum dan setelah perlakuan tidak terdapat perbedaan rerata kadar feritin darah sebelum dan setelah pada dosis perlakuan tersebut. Sedangkan pada kitosan dosis 32, 64 mg/kgBb dan kontrol negatif sebelum dan setelah perlakuan menunjukkan perbedaan yang bermakna rerata kadar feritin darah.

Tabel 3. Efektivitas kadar feritin darah sebelum dan setelah perlakuan

Kelompok Perlakuan	n	Kadar Feritin Darah pre $\bar{x} \pm SD$ (ng/ml)	Kadar Feritin Darah post $\bar{x} \pm SD$ (ng/ml)	p value
Dosis 16 mg/kgbb	5	7,48 ± 0,25	7,74 ± 0,33	0,239
Dosis 32 mg/kgbb	5	7,48 ± 0,25	10,94 ± 1,35	0,007
Dosis 64 mg/kgbb	5	7,48 ± 0,25	13,34 ± 1,39	0,001
Kontrol Positif	5	7,48 ± 0,25	7,55 ± 0,47	0,812
Kontrol Negatif	5	7,48 ± 0,25	14,14 ± 0,93	0,000

Tabel 4. Efektivitas Kadar besi hati sebelum dan setelah perlakuan

Kelompok Perlakuan	N	Kadar Fe Hati pre $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Kadar Fe Hati post $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	p value
Dosis 16 mg/kgbb	5	827,55 ± 107,91	3499,85 ± 568,63	0,000
Dosis 32 mg/kgbb	5	827,55 ± 107,91	3440,34 ± 314,68	0,000
Dosis 64 mg/kgbb	5	827,55 ± 107,91	2621,90 ± 632,28	0,003
Kontrol Positif	5	827,55 ± 107,91	2500,68 ± 429,91	0,001
Kontrol Negatif	5	827,55 ± 107,91	4474,97 ± 684,07	0,000

*paired t-test, p = 0,05*

Efektivitas dalam kelompok terhadap kadar zat besi hati menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata kadar Fe hati pada masing – masing kelompok perlakuan mempunyai perbedaan yang bermakna ( $p < \alpha$ ). Rerata kadar besi hati sebelum dan setelah

perlakuan mengalami peningkatan kadar Fe hati.

## PEMBAHASAN

Kitosan merupakan senyawa turunan dari kitin yang memiliki struktur *(1,4)-2-amino-2-Deoksi-β-D-Glukosa*. Sumber kitosan yang sangat potensial adalah kulit *Crustaceae*. Situs aktif kitosan baik dalam bentuk  $\text{NH}_2$  ataupun dalam keadaan terprotonasi  $\text{NH}_3^+$  mampu mengadsorpsi logam-logam berat melalui mekanisme pembentukan khelat atau penukar ion (7).

Feritin serum, salah satu petanda adanya *iron overload*, berguna dalam memonitor perubahan besi tubuh. Kelemahan feritin serum adalah kadar absolutnya tidak presisi dalam mewakili total besi tubuh. Parameter pengukuran *iron overload* yang lebih akurat adalah kadar besi hepar, yang diperoleh dari biopsi hepar yang bersifat invasif (8). Kadar besi hepar dapat menggambarkan kadar simpanan total besi tubuh (9).

Dari penelitian didapatkan bahwa pemberian kitosan 16 mg/kgBB memiliki efektivitas yang sama dengan kontrol positif dalam menurunkan feritin darah dengan nilai berturut-turut yaitu  $7,74 \pm 0,33$  dan  $7,55 \pm 0,47$ . Namun pada dosis 32 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB hanya menurunkan feritin darah sebesar  $10,94 \pm 1,35$  dan  $13,34 \pm 1,39$ . Ini menunjukkan bahwa kitosan dosis 16 mg/kgBB efektif menurunkan kadar feritin serum yang memiliki kemampuan yang sama dengan kontrol positif. Sedangkan terhadap kadar zat besi hati, kitosan dosis 64 mg/kgBB memiliki efektivitas yang sama dengan kontrol positif

dengan nilai berturut-turut yaitu  $2621,90 \pm 632,28$  dan  $2500,68 \pm 429,91$ . Sedangkan dosis 16 mg/kgBB dan 32 mg/kgBB hanya menurunkan kadar besi hati sebesar  $3499,85 \pm 568,63$  dan  $3440,34 \pm 314,68$ . Ini menunjukkan bahwa kitosan dosis 64 mg/kgBB efektif menurunkan kadar besi hati yang memiliki kemampuan yang sama dengan kontrol positif.

Kitosan merupakan produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, *biodegradable* dan biokompatibel. Kitosan memiliki gugus amino ( $\text{NH}_2$ ) yang relatif lebih banyak dibandingkan kitin sehingga lebih nukleofilik dan bersifat basa. Kitosan telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang mulai dari pangan, mikrobiologi, kesehatan, pertanian, industri dan sebagainya. Situs aktif kitosan baik dalam bentuk  $\text{NH}_2$  ataupun dalam keadaan terprotonasi  $\text{NH}_3^+$  mampu mengadsorpsi logam-logam berat melalui mekanisme pembentukan khelat dan atau penukar ion (10). Kitosan dosis 16 mg/kgBB yang dilarutkan dengan asam asetat 1% lebih encer dibandingkan kitosan dosis 32 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB. Hal ini menyebabkan luas permukaan lebih luas sehingga afinitas gugus amina terhadap besi lebih tinggi dibandingkan dua dosis lainnya. Selain itu feritin didalam darah cenderung mudah berubah dan terikat dengan hemoglobin, sehingga dosis kitosan 32 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB tidak efektif dalam menurunkan feritin darah, karena gugus  $\text{NH}_3$  memiliki afinitas terhadap gugus besi yang bebas, sedangkan feritin serum didalam darah dapat terikat dengan hemoglobin. Besi plasma atau besi yang beredar dalam sirkulasi darah terutama terikat oleh transferin sebagai protein pengangkut besi (11).

Besi bebas terdapat dalam dua bentuk yaitu *ferro* ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dan *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Konversi

kedua bentuk tersebut relatif mudah. Pada konsentrasi oksigen tinggi, umumnya besi dalam bentuk *ferri* karena terikat hemoglobin sedangkan pada proses transport transmembran, deposisi dalam bentuk feritin dan sintesis heme, besi dalam bentuk *ferro* (12). Hal inilah menjadi alasan kenapa dosis kitosan 64 mg/kgBB lebih efektif menurunkan kadar zat besi, karena kelebihan besi disimpan didalam hati dalam bentuk feritin, sehingga afinitas kitosan terhadap besi bebas akan membentuk kompleks yang mengakibatkan kadar zat besi menurun. Berdasarkan hal ini semakin besar konsentrasi kitosan maka semakin besar pula afinitasnya terhadap kadar zat besi bebas. Aktivitas kitosan akan meningkat seiring dengan peningkatan derajat deasetilasi (DD) kitosan, karena semakin besar DD menunjukkan semakin banyaknya gugus asetil dari kitin yang diubah menjadi situs aktif dalam kitosan (13).

Secara uji statistik, menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna, dimana apabila dilihat dari nilai pre dan post menunjukkan peningkatan kadar besi hati, sehingga dapat disimpulkan kitosan tidak efektif dalam menurunkan kadar feritin darah dan kadar besi hati. Namun secara klinis, terlihat ada perbaikan terhadap kadar feritin yang sebanding antara kontrol positif dan kitosan dosis 16 mg/kgBB dan perbaikan kadar besi hati sebanding antara kontrol positif dan kitosan dosis 64 mg/kgBB setelah dilakukannya induksi, walaupun tidak mendekati atau menyamai nilai kadar besi normal. Dengan demikian, perlu dilakukan penambahan waktu perlakuan agar penurunan kadar besi

hati terlihat perbedaan bermakna. Hal ini disebabkan oleh adanya pengaruh antara feritin, hemosiderin dan transferin.

## KESIMPULAN

Kitosan tidak efektif menurunkan kadar feritin darah dan kadar besi hati pada tikus putih wistar jantan *iron overload model*. Dosis efektif yang memiliki efektivitas yang sama dengan kontrol positif terhadap kadar feritin darah dan kadar besi hati berturut-turut adalah kitosan dosis 16 mg/kgBB dan kitosan dosis 64 mg/kgBB. Nilai kesetaraan kitosan 16 mg/kgBB dan 64 mg/kgBB terhadap kontrol positif (deferiprone) dalam mempengaruhi feritin darah dan kadar besi hati berturut-turut adalah 0,945 dan 0,996.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Seo, S. B., Kajiuchi, T, Kim, D, Lee, S, Kim, H. 2002. Preparation of water soluble chitosan blendmers and their application to removal of heavy metal ions from wastewater. *Micromoleculare Research*. 10 (2): 103– 107.
2. Siah, C. W., Trinder, D., Olynyk, J.K. 2005. Iron overload. *Clinica Chimica Acta*, 358: 24–36.
3. Lieu, P.T., Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y. 2001. The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 1–87.
4. Bentley, D.P. 2014. Iron overload: causes, consequences and control. *European Medical Journal*: 1-8.
5. Brissot, P., M. Ropert, C.L. Lan, and Loreal. 2012. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and

- iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820: 403-419.
6. Wahidayat, I. 2005. Masalah medikopsikososial thalassemia di masa mendatang di Indonesia. Dalam: Abdulsalam M, Windiastuti E, penyunting. kumpulan naskah KONAS X PHTDI: 29-30 Mei 2005; Denpasar, Indonesia. Denpasar: IDAI. h. 5.
  7. Knorr, D. 1984. Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science*. 47 (2): 36-38.
  8. Hoffbrand, A.V., Catovsky, D., Tuddenham E.G.D. 2005. *Postgraduate haematology*. Blackwell publishing.
  9. Quddus, F., Galili, N., Raza, A. 2011. Iron overload – screening and diagnosis. *US Oncological*.
  10. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., miralles, B., Acosta, N., Galed, G., and Heros, A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 9; 203-230.
  11. Cartwright, G.E. 1996. The anemia of chronic disorders. *Seminar haematology* (20); 61-80.
  12. Sukrat B. and Sirichotiyakul S. 2006. The prevalence and causes of anemia during pregnancy in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. *J. Med. Assoc. Thai*: 89(Suppl 4): S142-146.
  13. Manskarya, S., dan Drodora, T. V. 1968. *Geochemistry of organic substance*. Moscow: A.V.USSR.