

**STRES OKSIDATIF PADA HATI TIKUS  
YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK**

**TESIS**

**ABDUL HALIM SADIKIN  
NPM: 6105012011**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
DESEMBER 2008**

**HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS**

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar**

**Nama : Abdul Halim Sadikin**

**NPM : 6105012011**

**Tanda Tangan :**

**Tanggal : 09 Desember 2008**



**HALAMAN PENGESAHAN**

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Abdul Halim Sadikin

NPM : 6105012011

Program Studi : Ilmu Biomedik

Judul Tesis : Stres Oksidatif Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing I : Dr. Sri Widia A. Jusman, M.S.

Pembimbing II: DR. rer. physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi

Penguji I : Dr. Ani retno Prijanti, M.S.

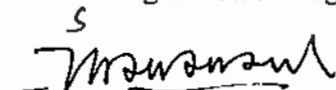
Penguji II : Dra. Eldafira, M.S.

Penguji III : DR. Frans Ferdinal, M.S.

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Desember 2008

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

*S*  


DR. rer. physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah S.W.T. karena atas berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik, pada Program Magister Ilmu Biomedik, Kekhususan Biokimia pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa dalam masa perkuliahan sampai pada masa penyusunan tesis ini, saya menerima bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Widia A. Jusman, M.S. sebagai dosen pembimbing akademis dan dosen pembimbing tesis I dan DR. rer. physiol., dr. Septelia Inawati Wanandi sebagai dosen pembimbing tesis II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini, dan memberikan bimbingan kepada saya selama menempuh pendidikan Magister Biomedik di FKUI ini.
2. Kepala Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, Ketua Program Magister Ilmu Biomedik, Ketua Program Studi Kekhususan Biokimia, para dosen, staf pengajar dan pegawai-pegawai di Program Studi Kekhususan Biokimia dan Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan bantuan kepada saya selama pendidikan dan penyelesaian tesis ini.
3. Orang tua saya yang telah membarikan bantuan dukungan material dan moral
4. Teman-teman saya yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata saya berharap agar Allah S.W.T. berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, Desember 2008

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK  
KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Abdul Halim Sadikin

NPM : 6105012011

Program Studi : Ilmu Biomedik

Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas : Kedokteran

Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Stres Oksidatif Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 09 Desember 2008

Yang menyatakan

Abdul Halim S.

## ABSTRAK

Nama : Abdul Halim Sadikin  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik FKUI, Kekhususan Biokimia  
Judul : Stres Oksidatif Pada Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik

Keadaan hipoksia menyebabkan peningkatan *Hypoxia Inducible Factor (HIF)* sebagai respon terhadap menurunnya kadar oksigen. Selain menyebabkan peningkatan HIF, hipoksia juga menyebabkan peningkatan pembentukan dan pelepasan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dari dalam mitokondria yang kemudian akan meregulasi respons terhadap  $O_2$  yang rendah. Akibat peningkatan pembentukan ROS, kemungkinan dapat terjadi stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan mengamati pengaruh hipoksia sistemik terhadap ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  dan stres oksidatif pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik selama 1, 3, 7 dan 14 hari yang dibandingkan dengan kelompok normoksia sebagai kontrol.

Induksi hipoksia sistemik dilakukan dengan memaparkan tikus jantan *Sprague-Dawley* terhadap lingkungan dengan oksigen 10% dan nitrogen 90% dalam sungkup hipoksia. Kadar protein, glutation (GSH) dan malondialdehid (MDA) diperiksa dari homogenat hati tikus. Kadar protein dihitung dengan mengukur serapan pada  $\lambda$  280 nm dan dibandingkan dengan serapan larutan standar *Bovine Serum Albumin*. Kadar malondialdehid (MDA) ditetapkan dengan metode Wills dan kadar glutation (GSH) diukur dengan metode Ellman. Analisis ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan menggunakan anti HIF 1- $\alpha$  sebagai antibodi primer, anti IgG *mouse* sebagai antibodi sekunder dan pewarnaan menggunakan *aminoethyl carbazole*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA hati meningkat mulai hari ke-1 hipoksia dan bertahan sampai 14 hari, walaupun tidak bermakna secara statistik. Kadar GSH hati menunjukkan penurunan yang bermakna seiring dengan lamanya hipoksia. Hasil *Western Blot* menunjukkan adanya HIF 1- $\alpha$  pada normoksia, hipoksia 1 hari dan 3 hari. Dapat disimpulkan bahwa terjadi stres oksidatif di jaringan hati seiring dengan lamanya hipoksia.

Kata kunci: Hipoksia sistemik, stres oksidatif, *Western Blot*, MDA GSH, HIF 1- $\alpha$

## ABSTRACT

Name : Abdul Halim Sadikin  
Study Program : Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Indonesia  
Title : Oxidative Stress in Liver of Systemic Hypoxia-Induced Rat.

Hypoxia condition increases the level of hypoxia-inducible factor (HIF) as response to oxygen deprivation. Hypoxia also increases production and releases of reactive oxygen species (ROS) from mitochondria. Excessive production of ROS can lead to oxidative stress, due to its reactivity with macromolecules within cell, i.e lipid. The objective of this study is to observe the effects of induction of systemic hypoxia on expression of HIF 1- $\alpha$  gene and its relation oxidative stress in rat liver tissue.

The experiment was conducted on 25 male Sprague-Dawley rats, which were divided into 5 groups : normoxic, hypoxia for 1 day, 3 days, 7 days and 14 days. Induction of systemic hypoxia was carried by exposing the rats in a hypoxic chamber with environment 10% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. To asses the oxidative stress condition, malondialdehyde (MDA) and glutation (GSH) concentration in liver was measured using Wills' and Ellman's method, respectively. Expression of HIF 1- $\alpha$  gene was analyzed using Western Blot.

The result showed that MDA concentration is higher in all hypoxic group with no statistically significance difference. The GSH level decreased significantly until day 14. It seemed that oxidative stress occurred at day 14. HIF 1- $\alpha$  was expressed in normoxic condition, hypoxia day 1 and day 3. It was concluded that oxidative stress was more likely to occur at day 14 of hypoxia.

Keywords: hypoxia, oxidative stress, MDA, GSH, HIF 1- $\alpha$ , liver, Western Blot

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN KARYA ILMIAH.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Hipotesis Penelitian.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Hipoksia.....	4
2.2 <i>Hypoxia Inducible Factor</i> (HIF).....	5
2.3 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS).....	7
2.4 Antioksidan.....	8
2.5 Stres Oksidatif Pada Hipoksia.....	9
2.6 Hipoksia Pada Hati.....	13
2.7 <i>Western Blot</i> .....	14
<b>BAB III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>17</b>



3.1 Rancangan Penelitian.....	17
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.3 Bahan Penelitian.....	17
3.4 Persiapan Homogenat Hati Tikus.....	20
3.5 Penentuan Kadar Protein Homogenat Hati.....	21
3.6 Pengukuran Kadar MDA Homogenat Hati (Metode Wills).....	21
3.7 Pengukuran Kadar GSH Homogenat Hati (Metode Ellman).....	22
3.8 Isolasi Protein.....	23
3.9 Elektroforesis.....	25
3.10 <i>Western Blot</i> .....	26
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Kadar Malondialdehid (MDA) jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik.....	28
4.2 Kadar Glutation (GSH) jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik.....	31
4.3 Analisis Hubungan Antara Kadar MDA dan GSH.....	35
4.4 <i>Western Blot</i> HIF 1- $\alpha$ .....	36
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	44
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	52

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme regulasi HIF 1- $\alpha$ .....	7
Gambar 2.2	Sintesis, mekanisme kerja dan <i>recycling</i> GSH dalam melawan-imbang produksi ROS.....	10
Gambar 2.3	Rantai transport electron dan terbentuknya ROS.....	11
Gambar 2.4	Reaksi antara MDA dan TBA membentuk pigmen TBA.....	13
Gambar 3.1	Sungkup hipoksia.....	19
Gambar 4.1	Kurva standar malondialdehid (MDA).....	28
Gambar 4.2	Kadar MDA jaringan hati kelompok tikus kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik.....	30
Gambar 4.3	Kurva protein <i>bovine serum albumin</i> (BSA).....	31
Gambar 4.4	Kurva standar glutation (GSH).....	32
Gambar 4.5	Kadar GSH jaringan hati kelompok tikus kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik.....	33
Gambar 4.6	Perbandingan kadar GSH dan MDA pada jaringan hati.....	35
Gambar 4.7	Hasil <i>Western Blot</i> dengan antibody monoklonal HIF 1- $\alpha$ .....	37
Gambar 4.8	Pewarnaan <i>ponceau red</i> 10% setelah <i>blotting</i> .....	38

**DAFTAR TABEL**

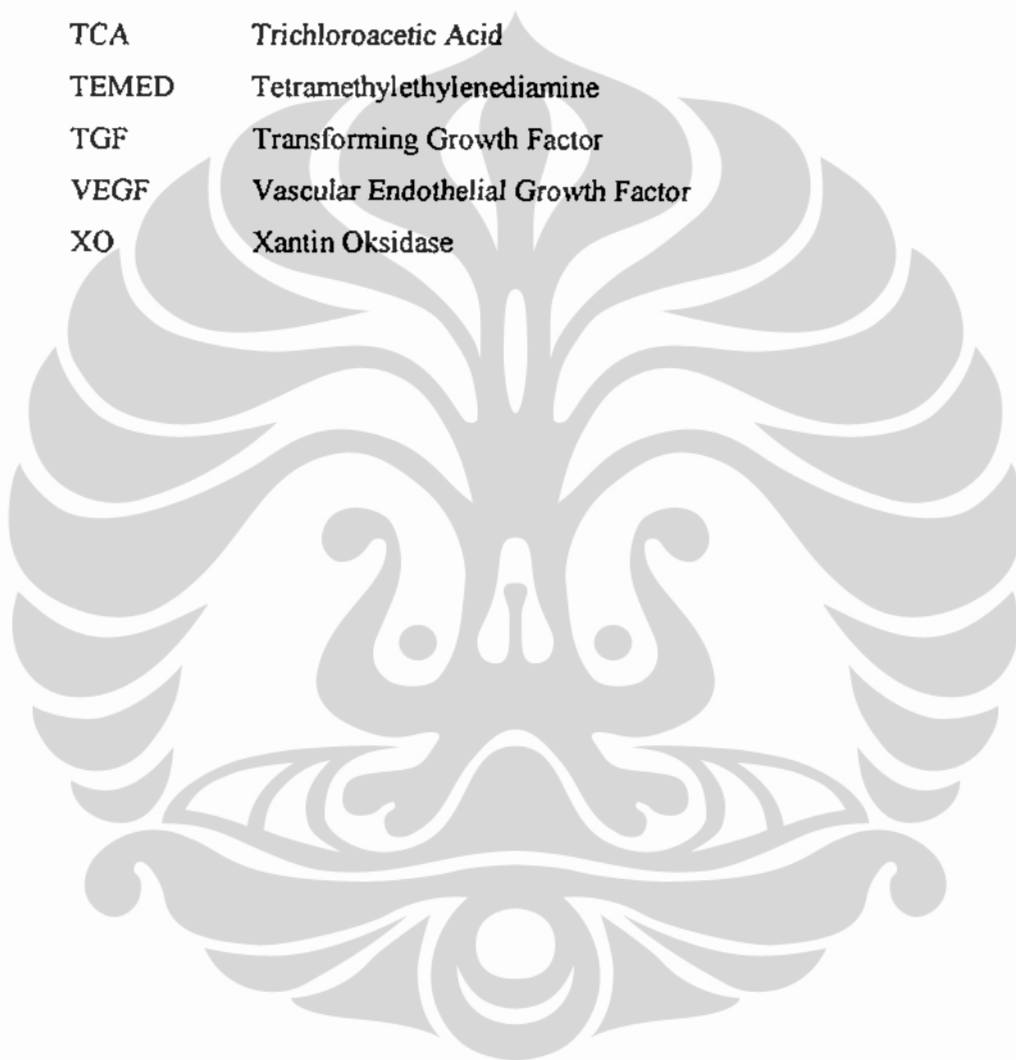
Tabel 4.1	Kadar MDA jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik (nmol/mg jaringan).....	29
Tabel 4.2	Kadar protein jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik (mg/mg jaringan hati).....	31
Tabel 4.3	Kadar GSH jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik (mg/mg protein).....	33



**DAFTAR SINGKATAN**

ADP	Adenosin Difosfat
AEC	Aminoethyl Carbazole
AP-1	Activator Protein-1
APS	Ammonium Persulfate
ARNT	Ariil Hydrocarbon Nuclear Translocator
ATP	Adenosin trifosfat
BM	Berat Molekul
BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
DTNB	Ditiobisnitrobenzoat
FADH	Flavin Adenin Dinukleotida
FGF	Fibroblast Growth Factor
GSH	Glutation
GSSG	Glutation disulfide
Hb	Hemoglobin
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HMP Shunt	Hexose Monophosphate Shunt
HRE	Hypoxia Response Element
kDa	Kilo Dalton
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinukleotida
ODD	Oxygen-dependent Degradation
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PHD	Protil Hidroksilase
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid

<b>PVDF</b>	<b>Polyvinylidene Fluoride</b>
<b>pVHL</b>	<b>Protein von Hippel-Landau</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribose Nucleic Acid</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</b>
<b>SOD</b>	<b>Superoksida Dismutase</b>
<b>TBA</b>	<b>Tiobarbituric Acid</b>
<b>TCA</b>	<b>Trichloroacetic Acid</b>
<b>TEMED</b>	<b>Tetramethylethylenediamine</b>
<b>TGF</b>	<b>Transforming Growth Factor</b>
<b>VEGF</b>	<b>Vascular Endothelial Growth Factor</b>
<b>XO</b>	<b>Xantin Oksidase</b>



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hipoksia adalah suatu keadaan dimana suplai oksigen tidak mencukupi untuk keperluan sel, jaringan atau organ. Keadaan hipoksia menyebabkan meningkatnya *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) sebagai respon terhadap menurunnya kadar oksigen. HIF 1 merupakan molekul protein heterodimer, terdiri dari subunit  $\alpha$  dengan BM 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar oksigen dan subunit  $\beta$  dengan BM 91-94 kDa yang merupakan protein konsitutif. HIF 1- $\alpha$  merupakan protein yang labil karena pada keadaan normal HIF 1- $\alpha$  didegradasi oleh sistem ubiquitin proteasom dan mengalami stabilisasi sebagai respon terhadap hipoksia (Giaccia, 2004). Agar aktif, HIF 1- $\alpha$  harus membentuk kompleks dengan HIF 1- $\beta$  dan keadaan ini dapat terpenuhi jika terjadi hipoksia. Kompleks ini kemudian bertranslokasi ke inti untuk berikatan dengan *hypoxia response element* (HRE) pada promotor gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen<sup>(1,2,3)</sup>. Sejumlah gen akan mengalami peningkatan regulasi yang bertujuan untuk mengurangi ketergantungan sel terhadap oksigen dan meningkatkan pasokan oksigen ke jaringan<sup>(4)</sup>. Banyak gen yang diregulasi oleh HIF-1 terlibat dalam mekanisme adaptasi terhadap hipoksia, seperti enzim jalur glikolisis, eritropoetin dan VEGF.

Selain menyebabkan meningkatnya HIF, hipoksia juga menyebabkan peningkatan pembentukan dan pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari dalam mitokondria yang kemudian akan meregulasi respons terhadap  $O_2$  yang rendah. Pembentukan ROS terjadi terutama pada kompleks III dari rantai transport elektron di dalam mitokondria. Pada pembentukan ubiquinol dari ubiquinon terbentuk radikal ubisemikinon. Radikal ini berpotensi untuk mendonorkan elektronnya kepada  $O_2$  sehingga terbentuk radikal anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ). Pada keadaan hipoksia, pembentukan ROS dari kompleks ini meningkat. Bila transport elektron dihambat dengan inhibitor pada tempat yang

Universitas Indonesia

lebih proksimal, dengan rotenon, ubikinon teroksidasi penuh dan pembentukan ROS pada kompleks III tidak terjadi<sup>(5)</sup>.

Bila kadar ROS melewati pertahanan antioksidan tubuh, ROS dapat bereaksi dengan lipid, protein dan DNA sehingga menyebabkan kerusakan sel<sup>(6,7)</sup>. Peroksidasi lipid merupakan reaksi antara radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh jamak yang banyak terdapat di membran. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan membran organel. Peroksida lipid akan mengalami degradasi antara lain menjadi malondialdehid (MDA)<sup>(8,9)</sup>. Ada mekanisme yang melawan-imbang produksi ROS. Glutation (GSH) merupakan antioksidan utama yang berperan penting dalam mempertahankan kesetimbangan redoks intrasel. Glutation dapat mereduksi ROS melalui reaksi yang dikatalisis glutathione peroksidase<sup>(10)</sup>.

Penelitian ini dilakukan dengan menginduksi hewan coba dengan hipoksia sistemik. Kondisi hipoksia sistemik dicapai dengan memasukkan hewan coba ke dalam *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 10% dan nitrogen 90%. Organ yang diamati pada penelitian ini adalah hati karena organ ini merupakan organ yang mengandung antioksidan endogen, terutama glutathione (GSH) sehingga perlu diteliti ketahanannya dalam menanggulangi ROS yang ditimbulkan oleh hipoksia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat disimpulkan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

- 1.2.1 Apakah terjadi stres oksidatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik?
- 1.2.2 Apakah induksi hipoksia sistemik menyebabkan peningkatan ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  pada hati tikus?

## 1.3 Hipotesis Penelitian

- 1.3.1 Induksi hipoksia sistemik akan meningkatkan kondisi stres oksidatif hati tikus.

1.3.2 Induksi hipoksia sistemik akan meningkatkan ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  hati tikus.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

##### 1.4.1 Tujuan umum

Menganalisis stres oksidatif dan ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  pada hati tikus yang diinduksi hipoksi sistemik.

##### 1.4.2 Tujuan khusus

- Mengukur kadar MDA akibat pembentukan peroksidasi lipid di jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
- Mengukur kadar GSH jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
- Mengukur kadar protein HIF 1- $\alpha$  semikuantitatif pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat

1. Memberikan kontribusi terhadap pemahaman mengenai respon sel terhadap hipoksia sistemik, khususnya jaringan hati.
2. Hubungan antara stres oksidatif dengan hipoksia sistemik dan kemungkinan penggunaan antioksidan untuk mengatasi stres oksidatif pada keadaan hipoksia.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Hipoksia

Oksigen sangat penting bagi manusia dan organisme eukariot lainnya, karena oksigen sangat dibutuhkan untuk mendapatkan energi. Energi didapat melalui rantai pernapasan di mitokondria. Sumber energi seperti glukosa diubah menjadi piruvat melalui jalur glikolisis di dalam sitoplasma sel. Di dalam mitokondria, molekul piruvat diubah menjadi asetil Ko-A dan mengeluarkan CO<sub>2</sub>. Asetil Ko-A melalui siklus Krebs dalam mitokondria akan menghasilkan elektron melalui pembentukan NADH dan FADH, yang akan menyumbangkan elektronnya ke proses fosforilasi oksidatif. Fosforilasi oksidatif berlangsung dalam membran mitokondria dan melibatkan empat kompleks protein (komplek I-IV). Aliran elektron melalui rantai transfer elektron akan menghasilkan perbedaan muatan proton membran dalam mitokondria. Perbedaan muatan proton ini akan digunakan untuk memfosforilasi ADP menjadi ATP. Keseluruhan proses glikolisis, siklus Krebs dan fosforilasi oksidatif berjalan dengan efisien dan menghasilkan 38 molekul ATP untuk setiap molekul glukosa yang digunakan<sup>(11)</sup>.

Dalam keadaan keseimbangan, hampir 90% dari oksigen yang tersedia dipergunakan oleh mitokondria untuk menghasilkan ATP melalui proses fosforilasi oksidatif. ATP yang dihasilkan berfungsi sebagai bahan bakar dari hampir semua proses sel. Oleh karena itu, keseimbangan suplai oksigen sangat dibutuhkan untuk kelangsungan fungsi dan daya tahan sel<sup>(12)</sup>.

Hipoksia terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara konsumsi oksigen seluler dengan ketersediaan cadangan oksigen bagi sel sehingga oksigenasi jaringan berkurang menjadi di bawah tekanan oksigen kritis. Tekanan oksigen kritis adalah tekanan minimal oksigen yang dibutuhkan untuk oksidasi sitokrom c dalam mitokondria secara sempurna. Kondisi seperti ini dapat terjadi akibat berbagai hal. Antara lain adalah menurunnya kapasitas transport O<sub>2</sub> oleh Hb (*anemic hypoxia*). Kondisi yang sama yang terlihat pada *anemic hypoxia* dapat juga terjadi karena pembentukan karboksihemoglobin pada perokok berat. Karbon

monoksida lebih tinggi afinitasnya terhadap hemoglobin sehingga pada perokok berat hemoglobin lebih kuat berikatan dengan karbon monoksida, yang menyebabkan kapasitas transpor oksigen oleh Hb menurun<sup>(13)</sup>.

Penyebab lain dari terjadinya hipoksia adalah aliran darah yang tidak baik pada jaringan. Pembuluh-pembuluh pada jaringan seringkali mempunyai fungsi dan struktur yang tidak normal seperti jaringan pembuluh yang tidak teratur, pemendekan, pemanjangan, kurangnya reseptor dan tidak adanya regulasi aliran darah. Selain itu hipoksia dapat juga disebabkan oleh gangguan difusi oksigen (*diffusional hypoxia*). *Diffusional hypoxia* terjadi karena meningkatnya jarak difusi, biasanya terjadi pada tumor. Hal ini menyebabkan tidak cukupnya cadangan oksigen dari pembuluh darah ke jaringan yang jauh. Penyebab hipoksia yang lainnya adalah tekanan parsial oksigen ( $pO_2$ ) yang rendah dalam darah arteri<sup>(13)</sup>.

Jaringan dapat bertahan terhadap keadaan hipoksia dalam waktu tertentu tergantung pada jaringan dan spesies organisme. Otot skelet lebih tahan terhadap hipoksia dibandingkan dengan jaringan saraf. Agar dapat beradaptasi terhadap hipoksia, jaringan harus mampu mengindera perubahan kadar  $O_2$  untuk mempertahankan homeostasis  $O_2$ <sup>(6)</sup>.

## 2.2 Hypoxia Inducible Factor (HIF)

HIF merupakan protein yang mengatur respons seluler dan sistemik terhadap keadaan hipoksia melalui peningkatan regulasi berbagai gen agar dapat beradaptasi terhadap perubahan kadar  $O_2$ . HIF-1 merupakan heterodimer, terdiri atas subunit  $\alpha$  dengan BM 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar  $O_2$  dan subunit  $\beta$  dengan BM 91-94 kDa yang merupakan protein konstitutif. HIF-1 $\alpha$  merupakan protein yang labil dan mengalami stabilisasi sebagai respons terhadap hipoksia, kelator ion dan kation divalent<sup>(6)</sup>.

HIF-1 $\beta$  dikenal juga sebagai ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Agar aktif, HIF-1 $\alpha$  harus membentuk kompleks dengan HIF-1 $\beta$ , yang kemudian bertranslokasi ke inti untuk kemudian berikatan dengan *hypoxia response element* (HRE) pada promotor gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen<sup>(1,2,3)</sup>. Banyak gen yang diregulasi oleh HIF-1 terlibat dalam

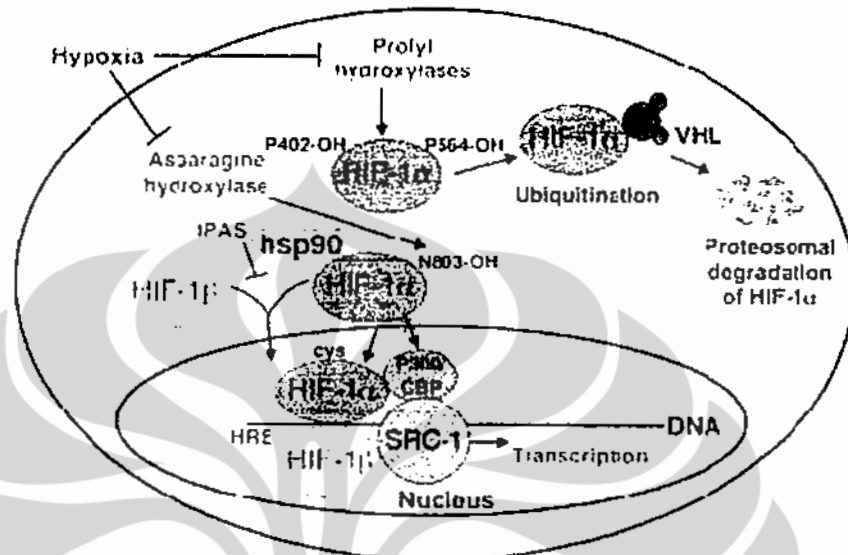
mekanisme adaptasi terhadap hipoksia, seperti enzim jalur glikolisis, eritropoetin dan VEGF.

HIF diregulasi melalui proses hidroksilasi yang tergantung  $O_2$  pada residu Pro402 dan Pro564 dalam molekul HIF-1 $\alpha$  atau HIF-2 $\alpha$  pada *oxygen-dependent degradation domain (ODD domain)*. Terdapat 3 prolil hidroksilase (PHD), yaitu PHD-1, PHD-2 dan PHD-3. PHD merupakan dioksigenase yang memerlukan  $O_2$  dan 2-oksoglutarat sebagai kosubstrat. PHD mengandung Fe yang berikatan dengan 2 residu His dan 1 residu Asn. Pengikatan  $O_2$  ini memerlukan vitamin C untuk mempertahankan Fe dalam bentuk fero. PHD mentransfer 1 atom oksigen ke residu Pro dari HIF-1 $\alpha$  dan 1 atom oksigen lainnya ke oksoglutarat membentuk suksinat dan  $CO_2$ . Bila  $O_2$  berkurang atau PHD mengalami inaktivasi karena kompetisi dengan substrat analog, residu Pro tidak mengalami perubahan. Efek yang sama ditemukan pula pada kelasi Fe, oksidasi dan adanya ion Co. Daerah transaktivasi pada C-terminal dari HIF-1 $\alpha$  juga mengalami hidroksilasi yang tergantung  $O_2$ . Hidroksilasi pada daerah ini terjadi pada residu Asn803 dan Asn851 yang mengatur aktivitas HIF-1 $\alpha$  setelah berikatan dengan koaktivator CBP/p300<sup>(2,3)</sup>.

Pada keadaan normoksia, hidroksilasi residu prolin akan menyebabkan degradasi proteolitik, karena berinteraksi dengan protein von Hippel-Lindau (pVHL), suatu protein supresor tumor. Interaksi terjadi melalui ikatan hidrogen dengan kantung pengikatan OH-Pro pada domain- $\beta$  pVHL. HIF yang telah berikatan dengan pVHL akan didegradasi melalui sistem ubiquitin-proteasom. Terdapat juga HIF-2 $\alpha$  dan HIF-3 $\alpha$ . HIF-2 $\alpha$  yang sangat mirip dengan HIF-1 $\alpha$  dalam hal struktur dan fungsi, tetapi ekspresinya terbatas pada jaringan tertentu. Juga terdapat perbedaan gen sasaran antara HIF-1 $\alpha$  dengan HIF-2 $\alpha$ .

Selain mekanisme stabilisasi HIF-1 $\alpha$  melalui hipoksia, banyak *growth factors* dan sitokin yang diketahui dapat menstabilisasi HIF-1 $\alpha$  pada keadaan normoksia<sup>(3)</sup>. Termasuk di dalamnya antara lain insulin, *insulin-like growth factors* 1 dan 2, *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor* 2, interleukin 1 $\beta$ , *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , angiotensin II, trombin, *transforming growth factor*  $\beta_1$ , *platelet-derived growth factor* dan *hepatocyte growth factor*. Kebanyakan dari *growth factor* ini kemungkinan menstabilisasi HIF-1 $\alpha$  melalui jalur kinase yang

diaktifkan melalui reseptor-reseptor tertentu. Tetapi belum diketahui bagaimana HIF-1 $\alpha$  akhirnya benar benar stabil melalui jalur-jalur ini.



Gambar 2.1. Mekanisme regulasi HIF 1- $\alpha$ , pada hipoksia <sup>(6)</sup>

### 2.3 Reactive Oxygen Species (ROS)

*Reactive Oxygen Species (ROS)* merupakan senyawa-senyawa turunan oksigen yang bersifat oksidan. Tiap atom oksigen mempunyai dua elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Atom atau molekul dengan elektron tidak berpasangan merupakan radikal bebas dan sangat reaktif. Reduksi oksigen menjadi air yang merupakan reaksi terakhir pada rantai transport elektron memerlukan empat elektron. Pemberian elektron kepada oksigen selama proses ini dapat membentuk ROS sebagai zat antara dan “kebocoran elektron” juga berperan dalam pembentukan ROS.

Singlet oksigen bersifat lebih reaktif dari oksigen stabil. Pemberian satu elektron kepada singlet oksigen menghasilkan pembentukan radikal superoksida ( $O_2^-$ ). Pemberian elektron kedua (penambahan elektron kepada radikal superoksida) menghasilkan pembentukan peroksida yang kemudian mengalami protonasi dan menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Pemberian elektron ketiga

membentuk radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) yang sangat reaktif. Dan akhirnya pemberian elektron keempat menghasilkan pembentukan air.

ROS dapat terbentuk di jaringan melalui berbagai mekanisme. Pembentukan ROS dapat terjadi dari reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase (XO), NAD(P)H oksidase, sitokrom P450, melalui autooksidasi katekolamin dan *uncoupling* NO sintase (NOS). NO mengandung elektron yang tidak berpasangan dan dapat bereaksi dengan  $\text{O}_2\cdot^-$  dan membentuk peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) yang merupakan suatu oksidan kuat <sup>(8)</sup>.

Terdapat beberapa mekanisme seluler yang melawan-imbang produksi ROS, baik secara enzimatik maupun non enzimatik. Jalur enzimatik yang sangat dikenal adalah katalase dan glutathion peroksidase yang mengkatalisis  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi air. Selain itu ada pula superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis pembentukan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dari  $\text{O}_2\cdot^-$ . Mekanisme non enzimatik meliputi antioksidan intraseluler seperti vitamin E, C dan  $\beta$ -karoten (prekursor vitamin A), ubikuinon dan asam lipoat.

ROS berperan pada beberapa proses biologis. ROS diketahui berperan pada bermacam-macam jalur transduksi sinyal, yaitu berperan sebagai *second messengers* bagi ligan-ligan tertentu seperti TGF- $\beta$ 1, PDGF, ATII, FGF-2, endotelin dan lain-lain. ROS juga berperan memodulasi aktivitas faktor transkripsi termasuk NF- $\kappa$ B dan *activator protein-1* (AP-1). Pengaruh biologis ROS yang paling dikenal adalah ketika ROS bereaksi langsung dengan lipid seluler, protein dan DNA sehingga mengakibatkan kematian dan kerusakan sel <sup>(7)</sup>.

## 2.4 Antioksidan

Halliwell mendefinisikan antioksidan sebagai suatu substansi yang pada konsentrasi rendah dapat mencegah atau memperlambat oksidasi secara signifikan walaupun kadarnya lebih rendah dibandingkan dengan zat yang dioksidasi tersebut <sup>(8)</sup>.

Antioksidan dapat disintesis secara *in vivo* (antioksidan endogen) atau dapat pula berasal dari makanan (antioksidan eksogen). Terdapat beberapa kategori antioksidan, yaitu <sup>(8)</sup>.

1. Enzim-enzim yang mengkonversi ROS menjadi molekul yang tidak reaktif. Misalnya superoksida dismutase (SOD), superoksida reduktase, katalase dan enzim-enzim peroksidase.
2. Molekul yang mengurangi pembentukan ROS. Pada kategori ini termasuk protein yang meminimalisasi tersedianya pro-oksidan, misalnya transferrin, albumin, haptoglobin, haemopexin, haem oksigenase dan metalotionein.
3. Molekul yang dioksidasi oleh ROS untuk melindungi biomolekul yang lebih penting. Misalnya glutation (GSH),  $\alpha$ -tokoferol, bilirubin, askorbat, dan plasmogen.

Perlindungan antioksidan berbeda antara jaringan yang satu dengan yang lain, juga antara tipe sel yang satu dengan tipe sel yang lain. Sebagai contoh, sel punca embrionik kaya akan antioksidan tetapi menjadi semakin berkurang ketika sel berdiferensiasi. Seringkali perlindungan antioksidan meningkat setelah suatu organisme terpapar pada ROS dan beberapa sitokin.

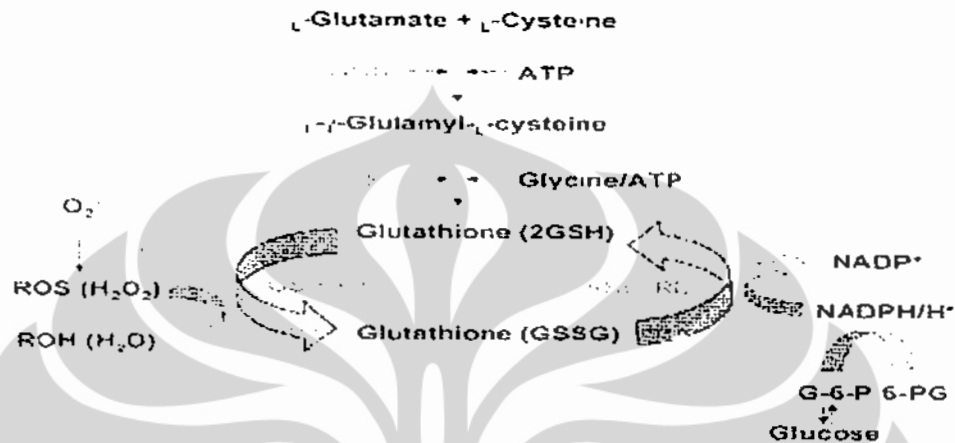
#### 2.4.2 Glutation (GSH)

Glutation merupakan antioksidan endogen dan reduktor intrasel yang penting. GSH disintesis dari asam amino glutamat, sistein dan glisin. Sintesisnya terdiri atas dua tahap. Tahap pertama adalah pembentukan  $\gamma$  glutamil-sistein dari asam amino glutamat dan sistein dengan bantuan enzim  $\gamma$ -glutamilsistein sintetase ( $\gamma$ -GCS). Tahap kedua adalah penambahan glisin pada ujung C dari  $\gamma$ -glutamilsistein sehingga membentuk glutation tereduksi (GSH). Reaksi ini dikatalisis oleh enzim glutamil sintase (GS). Kedua tahap ini membutuhkan ATP agar dapat berjalan<sup>(10)</sup>.

Fungsi GSH disebabkan oleh adanya gugus -SH yang terdapat pada residu sistein dari GSH. GSH dapat menguraikan  $H_2O_2$  atau peroksida organik lainnya dengan bantuan enzim glutation peroksidase sehingga terbentuk  $H_2O$  dan GSH teroksidasi menjadi GSSG.  $H_2O_2$  merupakan hasil konversi anion superoksida oleh enzim superoksida dismutase (SOD). GSSG tidak dapat berfungsi sebagai antioksidan, oleh karena itu harus dapat direduksi kembali menjadi GSH dengan bantuan enzim GSSG reduktase. Enzim ini membutuhkan ko-faktor NADPH

untuk reaksinya<sup>(14,15)</sup>. NADPH ini berasal dari jalur *HMP Shunt*, yaitu pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim glukosa 6-P dehidrogenase<sup>(14)</sup>.

Skema sintesis, mekanisme kerja dan *recycling* GSH ditampilkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Sintesis, mekanisme kerja dan *recycling* GSH dalam melawangi produksi ROS<sup>(10)</sup>

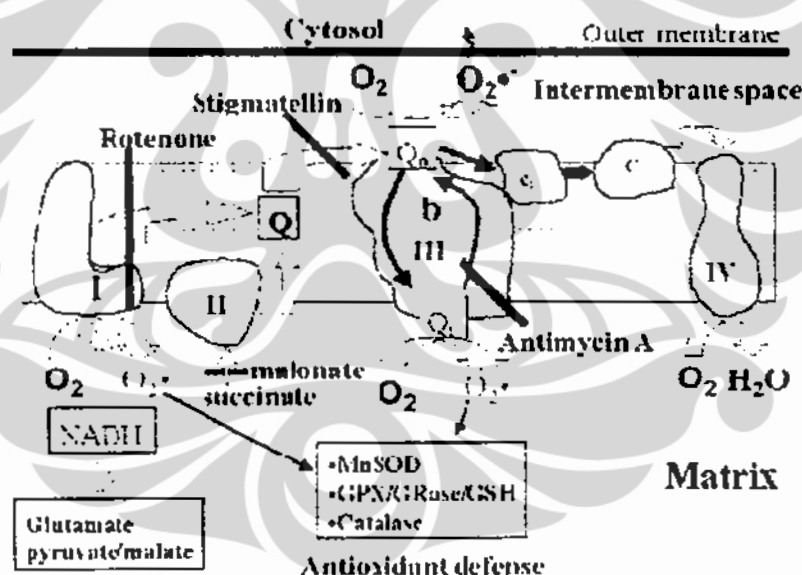
GSH dapat disintesis di semua sel, terutama jaringan yang terpapar terhadap jumlah ROS yang tinggi. Kadar GSH paling tinggi ditemukan di dalam jaringan hati dan juga lensa mata<sup>(8)</sup>.

## 2.5 Stres Oksidatif Pada Hipoksia

*Reactive oxygen species* (ROS) merupakan senyawa turunan oksigen yang bersifat reaktif. ROS dapat terbentuk pada keadaan fisiologis maupun patologis. Sifat reaktif ROS dapat diredam oleh antioksidan yang terdapat di dalam sel, sehingga tidak terjadi efek merugikan dari ROS yang dapat merusak makromolekul di dalam sel. Apabila jumlah ROS melebihi kapasitas antioksidan untuk mengatasinya maka akan terjadi ketidakseimbangan antara ROS dengan antioksidan, sehingga timbul keadaan yang disebut sebagai stres oksidatif.

Selama hipoksia, proses pembentukan ROS akan meningkat dan hal ini akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Hipoksia secara paradoks merangsang pembentukan dan pelepasan ROS dari dalam mitokondria yang

kemudian akan meregulasi respon terhadap  $O_2$  yang rendah<sup>(5)</sup>. Transpor elektron di mitokondria dimediasi oleh protein seperti suksinat-koenzim Q reduktase (pada kompleks II) dan koenzim Q-sitokrom c reduktase (pada kompleks III). Pembentukan ROS di mitokondria terjadi terutama pada kompleks III dari rantai transport elektron di dalam mitokondria. Pembentukan ubikinol dari ubikinon biasanya membentuk ubisemikinon yang merupakan radikal bebas. Radikal ini berpotensi untuk mendonorkan elektronnya yang tidak berpasangan kepada  $O_2$  sehingga terbentuk radikal anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ). Pada keadaan hipoksia, pembentukan ROS dari kompleks III ini meningkat. Bila transport elektron dihambat dengan inhibitor pada tempat yang lebih proksimal, dengan rotenon, ubikinon teroksidasi penuh dan pembentukan ROS pada kompleks III tidak terjadi. Peningkatan ROS ini akan memicu jalur transduksi sinyal yang antara lain akan menyebabkan stabilnya HIF 1- $\alpha$  yang selanjutnya menyebabkan diekspresikannya berbagai protein sebagai respon terhadap hipoksia<sup>(6,5,16,25)</sup>. Pembentukan ROS pada keadaan hipoksia ditampilkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Rantai transport elektron dan terbentuknya ROS<sup>(16)</sup>

Stres oksidatif berdampak buruk bagi tubuh karena dapat bereaksi dengan lipid, protein dan DNA sehingga menyebabkan kerusakan sel<sup>(6,7)</sup>.



Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi stres oksidatif adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid didefinisikan oleh Tappel sebagai teroksidasinya senyawa lipid yang memiliki dua atau lebih ikatan rangkap (*polyunsaturated fatty acid* = PUFA) <sup>(8)</sup>. PUFA merupakan salah satu komponen yang menentukan fluiditas membran. Rusaknya PUFA akan menyebabkan penurunan fluiditas membran yang akan berpengaruh pada fungsi membran terutama sebagai tempat difusi molekul antar sel ataupun intrasel (membran organel) <sup>(15)</sup>.

Proses peroksidasi lipid ini dapat dibagi menjadi beberapa tahap yaitu <sup>(15)</sup>:

### 1. Tahap inisiasi

Pada tahap ini terjadi reaksi yang menyebabkan satu atom H terpisah dari gugus metilennya (-CH<sub>2</sub>-). Asam lemak yang tidak memiliki atau hanya memiliki satu ikatan ganda lebih resisten terhadap proses ini dibandingkan PUFA. Di membran dan lipoprotein, terpaparnya rantai samping PUFA pada permukaan luar menyebabkan reaksi ini lebih mudah terjadi .

### 2. Tahap propagasi

Hilangnya satu atom H mengakibatkan gugus metilen memiliki satu elektron yang tidak berpasangan. Radikal karbon ini dapat saling bergabung membentuk konyugat diene (R-C-C-R). Radikal karbon jika bereaksi dengan oksigen akan mengakibatkan terbentuknya radikal peroksil (ROO/ RO<sub>2</sub>). Hal ini akan menyebabkan reaksi berantai peroksidasi berlanjut.

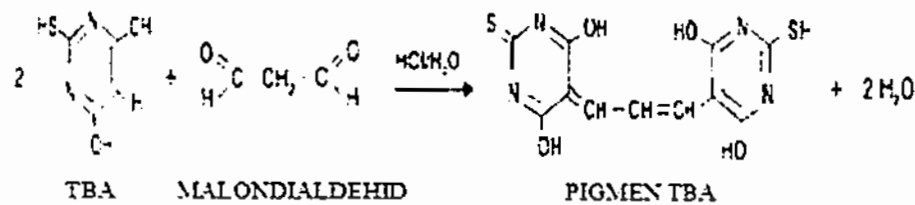
Pada kadar oksigen yang rendah, radikal karbon ini dapat bereaksi dengan sesama radikal, atau atom karbon lainnya (mengambil satu atom H molekul lipid lainnya), ataupun komponen membran lainnya seperti gugus sulfida protein.

### 3. Tahap terminasi

Proses terminasi dapat terjadi karena penggabungan dengan radikal lain sehingga terbentuk senyawa yang bersifat tidak radikal seperti konyugasi diene. Pada tahap terminasi ini juga berperan senyawa-senyawa atau reaksi-reaksi anti-oksidan seperti asam askorbat, vitamin E dan glutathion.

Peroksida lipid dapat dengan mudah diubah menjadi senyawa lain yang sangat reaktif dan mudah dilacak, yaitu malondialdehid (MDA) <sup>(8,9)</sup>. MDA dapat digunakan untuk mengukur peroksidasi lipid. Bila MDA direaksikan dengan asam

tiobarbiturat (TBA) maka akan terbentuk senyawa berwarna merah muda yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 530-532 nm.



Gambar 2.4. Reaksi antara MDA dan TBA membentuk pigmen TBA <sup>(8)</sup>

## 2.6 Hipoksia Pada Hati

Hati merupakan organ tubuh manusia terbesar dengan berat 1200 sampai 1600 gram dan menempati hampir seluruh rongga abdomen. Konsistensinya lunak, berwarna merah tua/ coklat yang disebabkan oleh adanya darah yang amat banyak. Hati mendapat darah dari vena porta dan arteri hepatica. Hati merupakan salah satu organ yang melakukan banyak fungsi penting dalam tubuh, terutama yang berhubungan dengan metabolisme zat gizi serta sebagian besar obat dan zat toksik. Senyawa toksik biasanya akan mengalami proses detoksifikasi. Pada hewan coba telah dibuktikan bahwa kerusakan 80% parenkim, hati masih dapat mempertahankan fungsi normal. Demikian pula halnya pada manusia, pada kerusakan hati yang luas sekali, baru terlihat gejala klinik.

Hati mempunyai berbagai fungsi, antara lain:

1. Metabolisme, terutama metabolisme karbohidrat, lemak dan protein.
2. Sintesis protein plasma seperti albumin dan globulin serta memproduksi empedu.
3. Mensintesis faktor pembekuan darah.
4. Eritropoesis.
5. Detoksifikasi

Pada sel-sel parenkim hati terbentuk gradien oksigen akibat aliran darah yang bersifat satu arah dari arah vena porta dan periportal ke vena sentral (perivenus). Gradien oksigen ini makin bertambah karena adanya proses metabolisme yang mengkonsumsi oksigen pada sel-sel parenkim dan membuat

tekanan oksigen menurun dari 60-65 mmHg di daerah periportal menjadi 30-35 mmHg di vena sentral (*perivenus*). Akibatnya terdapat 3 zona metabolisme pada hati berdasarkan konsumsi oksigen. Hepatosit pada daerah periportal (zona 1) dan perivenular (zona 3) mempunyai perbedaan kapasitas metabolisme dan struktur sub-seluler. Secara morfologis pun keduanya berbeda. Hepatosit pada zona 1 mengandung badan Golgi dua kali lebih banyak, lisosom lebih banyak dan lebih sedikit retikulum endoplasma halus dibandingkan hepatosit di zona 3 <sup>(18)</sup>.

Hepatosit pada daerah periportal merupakan daerah yang pertama kali dialiri darah sehingga kaya akan oksigen dan metabolismenya tergantung oksigen. Karena posisinya yang demikian, area ini kecil kemungkinan mengalami defisiensi nutrisi ataupun aliran darah. Sel-sel pada daerah perivenus mendapatkan darah dengan kandungan oksigen lebih rendah sehingga daerah ini lebih rentan terhadap iskemia dan nekrosis. Seperti pada jaringan lain, ketika hati mengalami hipoksia, sel-sel beradaptasi agar dapat bertahan. Adaptasi ini bertujuan untuk meningkatkan cadangan oksigen dan mengkompensasi kehilangan energi <sup>(18)</sup>.

Gradien oksigen di parenkim hati berperan penting dalam regulasi gen yang mengkode enzim-enzim untuk metabolisme karbohidrat. Sebagai contoh, enzim-enzim glikolisis seperti glukokinase atau piruvat kinase ekspresinya menguat pada area yang kurang aerob yaitu zona perivenus, sedangkan enzim-enzim glukoneogenesis lebih dominan ekspresinya di zona periportal yang lebih aerob. Faktor transkripsi yang diketahui terlibat pada sintesis enzim-enzim ini adalah HIF-1, HNF-4 dan p300. Ditemukan bahwa pada jaringan hati tikus terdapat 3 macam subunit HIF- $\alpha$ . mRNA dari HIF 1- $\alpha$ , HIF 2- $\alpha$  dan HIF 3- $\alpha$  ditemukan dominan pada zona perivenus, akan tetapi ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  tidak terzonasi. Protein ini ditemukan merata dalam sitosol hepatosit dengan kadar yang rendah, sedangkan dalam nukleus terdapat dengan kadar yang tinggi, baik pada daerah periportal maupun perivenus. Ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  ternyata juga ditemukan di hepatosit jaringan hati tikus normal <sup>(17,18)</sup>, walaupun banyak peneliti menyatakan bahwa HIF 1- $\alpha$  mengalami stabilisasi pada keadaan hipoksia.

## 2.7 Western Blot

*Western blot* atau seringkali disebut *immunoblot* adalah suatu teknik analisis yang digunakan untuk mendeteksi suatu protein spesifik dari homogenat atau ekstrak jaringan. Teknik ini menggunakan metode SDS-PAGE untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Kemudian protein ditransfer ke suatu membran yang biasanya terbuat dari bahan nitroselulosa atau PVDF (*polyvinylidene fluoride*), dimana kemudian sampel dideteksi menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein yang diinginkan<sup>(19,20)</sup>.

Sampel dapat diambil dari seluruh jaringan ataupun dari hasil kultur sel. Sampel jaringan dapat dihancurkan menggunakan blender, *homogenizer* ataupun sonikasi. Selama penghancuran jaringan biasanya ditambahkan deterjen, garam atau buffer untuk membantu lisis sel dan melarutkan protein. Inhibitor fosfatase dan protease juga ditambahkan untuk mencegah penghancuran sampel oleh enzimnya sendiri.

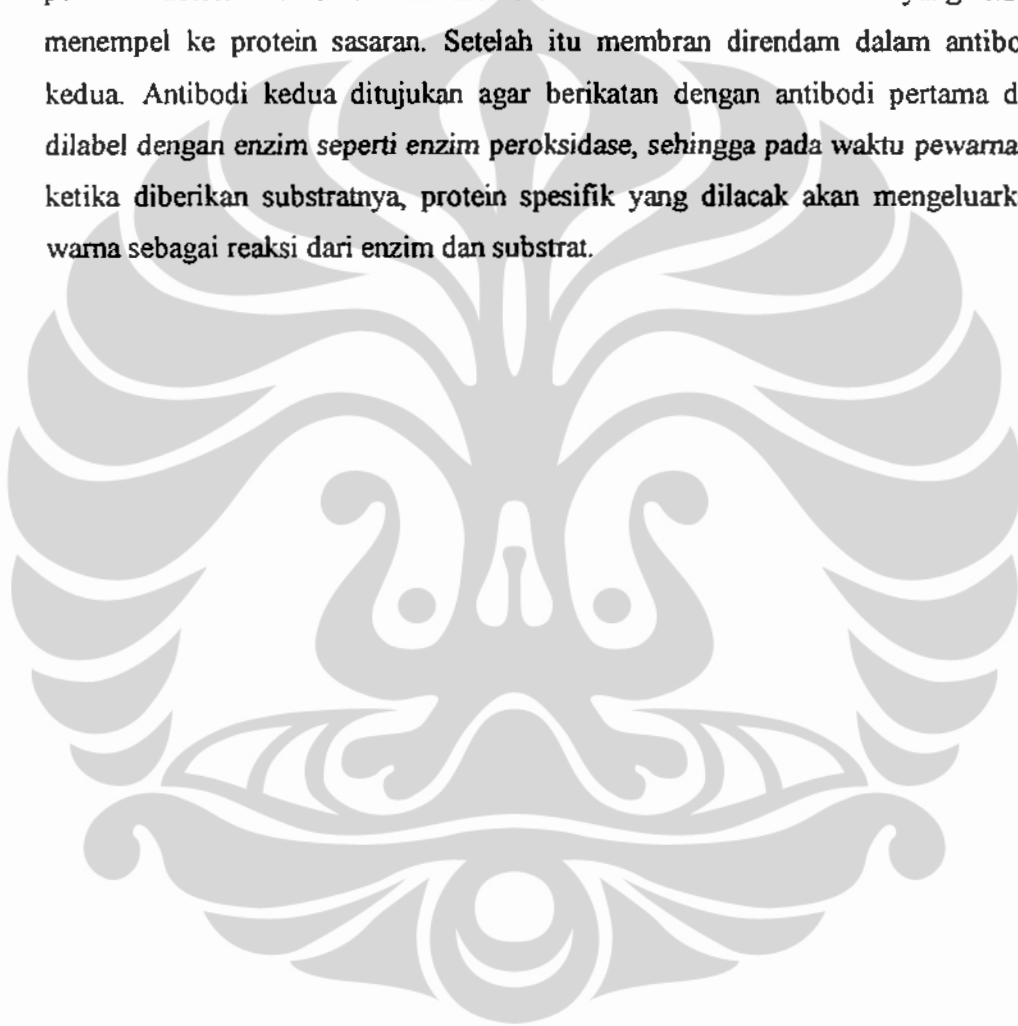
Protein dari jaringan dipisahkan menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Metode ini memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Dengan demikian protein dengan ukuran lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat melewati pori-pori gel, sedangkan yang berukuran lebih besar bermigrasi lebih lambat.

Agar protein dapat dideteksi oleh antibodi spesifiknya, protein harus ditransfer dari gel ke suatu membran yang terbuat dari bahan nitroselulosa atau PVDF (*blotting*). Membran diletakkan diatas gel dan beberapa lembar kertas saring diletakkan diatasnya. Membran, gel dan kertas saring diletakkan di dalam suatu larutan buffer. Larutan ini, dengan adanya gerak kapilarisasi, akan meresap ke atas dari gel ke membran dan dengan bersama membawa protein dari gel ke membran. Metode lain adalah dengan menggunakan arus listrik dan menarik protein dari gel ke membran. Pada metode ini membran diletakkan di bawah gel.

Membran yang digunakan terbuat dari bahan nitroselulosa dan PVDF karena kemampuannya mengikat protein. Karena antibodi spesifik yang digunakan juga berupa protein, maka harus dilakukan pencegahan agar antibodi tidak berikatan dengan membran. Pencegahan ini dikenal dengan sebutan *blocking*. *Blocking* biasa dilakukan dengan merendam membran ke dalam larutan

yang mengandung protein (BSA atau susu skim) dengan sedikit deterjen seperti Tween-20. Protein pada larutan akan berikatan ke semua tempat di membran, kecuali di tempat yang sudah terblot oleh protein dari gel, sehingga ketika antibodi ditambahkan, antibodi hanya akan berikatan di protein spesifiknya.

Untuk melacak protein yang diinginkan, membran direndam dalam larutan yang mengandung antibodi spesifik dan diinkubasi. Lamanya inkubasi bervariasi, dari 30 menit hingga semalaman. Selanjutnya membran direndam dalam larutan pencuci untuk membersihkan membran dari sisa-sisa antibodi yang tidak menempel ke protein sasaran. Setelah itu membran direndam dalam antibodi kedua. Antibodi kedua ditujukan agar berikatan dengan antibodi pertama dan dilabel dengan enzim seperti enzim peroksidase, sehingga pada waktu pewarnaan ketika diberikan substratnya, protein spesifik yang dilacak akan mengeluarkan warna sebagai reaksi dari enzim dan substrat.



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari suatu proyek penelitian dengan tema hipoksia. Penelitian ini dilakukan dengan cara eksperimen *in vivo* pada hewan coba. Bahan yang diperiksa dari hewan coba adalah organ hati. Organ hati diperoleh dari 5 kelompok tikus perlakuan yaitu: kelompok kontrol (*normoksia*), kelompok hipoksia 1 hari, kelompok hipoksia 3 hari, kelompok hipoksia 7 hari dan kelompok hipoksia 14 hari <sup>(26)</sup>. Tikus diperoleh dari laboratorium LKM Depkes RI Jakarta.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat. Penelitian berlangsung sekitar 9 bulan, mulai Maret 2008 sampai dengan November 2008.

### 3.3 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu organ hati dari hewan coba tikus (*Rattus sp. strain Sprague-Dawley*) jantan berumur 6 minggu dengan berat badan 200-250 gram yang telah mengalami perlakuan hipoksia. Organ hati hasil perlakuan hipoksia ini disimpan di *deep freezer* bersuhu  $-84^{\circ}\text{C}$ , bila tidak langsung dikerjakan.

#### 3.3.1 Penetapan jumlah sampel

Jumlah sampel untuk tiap perlakuan dihitung berdasarkan rumus Federer <sup>(21)</sup>, yaitu:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

dimana : t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan di tiap kelompok

Perlakuan dalam penelitian ini dibagi lima, yaitu:

- Kontrol (K): sampel hati tikus yang tidak mengalami hipoksia (normoksia).
- Perlakuan 1 (P1): sampel hati tikus yang mengalami hipoksia selama 1 hari.
- Perlakuan 2 (P2): sampel hati tikus yang mengalami hipoksia selama 3 hari.
- Perlakuan 3 (P3): sampel hati tikus yang mengalami hipoksia selama 7 hari.
- Perlakuan 4 (P4): sampel hati tikus yang mengalami hipoksia selama 14 hari.

Berdasarkan rumus Federer di atas dan jumlah perlakuan maka didapatkan jumlah minimal sampel untuk masing-masing perlakuan adalah 5 (lima) sampel.

### 3.3.2 Perlakuan hipoksia

#### 3.3.2.1 Bahan

Gas campuran khusus dalam tangki gas yang mengandung oksigen 10% dan nitrogen 90% (PT. Samator, Jakarta), makanan dan minuman tikus dan serbuk gergaji untuk alas kandang.

#### 3.3.2.2 Alat

Sungkup hipoksia (*Plexyglass Hypoxic Chamber*), 2 (dua) set: ukuran besar (kapasitas 6 ekor tikus) dan kecil (kapasitas 4 ekor tikus) (Prof. Hui-jin Chen, *Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai-P.R. China*), *digital oxygen meter (OX-12B)* no. 05213 (MIEI, Shanghai-P.R. China), tabung gas oksigen dan nitrogen serta pengatur tekanan aliran, neraca analitik (Sartorius) dan set alat untuk membedah tikus.



Gambar 3.1. Sungkup hipoksia

### 3.3.2.3 Perlakuan

Sebelumnya, tikus diperiksa dan ditimbang. Untuk membedakan tikus sesuai dengan beratnya, maka tikus ditandai tubuhnya. Kandang perlakuan hipoksia dipersiapkan beserta makanan (200 g) dan minuman (dua botol masing-masing 250 mL). Setelah kandang dipersiapkan dan setiap bagian diperiksa, gas campuran dialirkan dengan kecepatan 3 mL/menit selama 15 menit. Penurunan oksigen diamati dengan oksigen meter dan kipas dinyalakan untuk menambah sirkulasi udara. Jika kadar oksigen turun menjadi 10% oksigen dan 90% nitrogen maka kecepatan aliran diturunkan menjadi 1-2 mL/menit.

Tikus dimasukkan ke dalam kandang setelah kadar udara dalam sungkup cukup stabil selama 5-10 menit. Waktu pada saat tikus dimasukkan dicatat sebagai jam nol.

Selama perlakuan, kondisi tikus dan sungkup diamati. Pengamatan sungkup terutama pada kadar oksigen, kecepatan aliran dan sirkulasi udara. Kondisi optimal ditandai dengan stabilnya kadar oksigen. Sirkulasi udara yang baik ditandai dinding sungkup yang tidak berembun dan gelembung udara CO<sub>2</sub> dapat diamati dalam botol yang mengandung larutan kalsium karbonat jenuh. Pembersihan kandang serta penggantian makanan dan minuman tikus dilakukan sekali 2 hari. Pada pembersihan ini tikus dipindahkan sementara pada sungkup yang lebih kecil yang telah dioptimalisasi dengan kadar oksigen tetap 10%.

Tikus dikorbankan pada akhir perlakuan. Dengan menggunakan eter, tikus kemudian dibius. Dalam kondisi terbius tikus dikeluarkan dari sungkup,



ditimbang dan kemudian ditelentangkan di atas papan gabus. Keempat kaki direntangkan sejauh mungkin dan difiksasi ke papan operasi dengan menggunakan jarum pentul.

Permukaan perut dibasahi dengan alkohol, kemudian dinding perut di daerah median dijepit dengan pinset dan digunting dengan arah melintang. Akan segera tampak peritoneum. Peritoneum digunting dalam arah yang sama sejauh-jauhnya. Pengguntingan dilakukan ke arah tulang dada sampai diafragma. Diafragma digunting ke arah belakang. Selanjutnya beberapa organ dan juga darah dipisahkan untuk beberapa penelitian. Organ hati ditimbang dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Persiapan Homogenat Hati Tikus

#### 3.4.1 Bahan

Jaringan hati hewan coba tikus jantan *Sprague Dawley* yang telah mengalami perlakuan hipoksia dan disimpan dalam suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ , larutan dapar fosfat (PBS/*phosphate buffer saline*) 0,1M pH 7,4, *dry ice*, es, dan akuades.

#### 3.4.2 Alat

Mikrotube 1,5 mL steril, sarung tangan dan alat-alat pemotong jaringan steril, alat-alat gelas steril, *homogenizer* serta mortar, *sentrifuge* dan neraca analitik (Sartorius).

#### 3.4.3 Cara kerja

Jaringan hati dikeluarkan dari *deep freezer*  $-80^{\circ}\text{C}$  dan suhu di sekitar jaringan tetap dijaga  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  dengan meletakkan es dan es kering di sekitar jaringan. Setelah jaringan tidak beku maka jaringan hati diambil sebanyak 100 mg dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Sisa jaringan dikembalikan ke dalam *deep freezer*.

Proses pembuatan homogenat dilakukan dengan menggunakan mikro *homogenizer* dalam kondisi dingin. Jaringan kemudian ditambah larutan dapar fosfat 0,1M pH 7,4 sampai volume 1 mL. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi

pada suhu 4°C, 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dan disimpan pada suhu 4°C.

### 3.5 Penentuan Kadar Protein Homogenat Hati

Kadar protein homogenat diukur pada  $\lambda$  280 nm dengan menggunakan kurva standar protein yang diperoleh dari protein albumin serum sapi (*bovine serum albumin/ BSA*).

#### 3.5.1 Bahan

Larutan BSA dalam berbagai kadar (dalam hal ini kadar 0mg/mL, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL dan 1mg/mL), homogenat hati dan akuades.

#### 3.5.2 Alat

Spektrofotometer UV (*SmartSpec-Plus, Biorad<sup>®</sup>*), kuvet, mikropipet berbagai ukuran beserta tips, alat gelas dan tabung.

#### 3.5.3 Cara kerja

Masing-masing kadar larutan BSA dibaca serapannya pada  $\lambda$  280 nm. Hasil serapan masing-masing kadar dibuat menjadi satu kurva standar. Homogenat ginjal dibaca serapannya pada  $\lambda$  280 nm. Jika serapan homogenat melebihi serapan kadar standar, maka dilakukan pengenceran dengan akuabides. Kadar protein homogenat diukur berdasarkan serapan homogenat dan kurva standar.

### 3.6 Pengukuran Kadar MDA (malondialdehid) Homogenat Hati (metode Wills)

MDA bereaksi dengan TBA akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang diukur serapannya pada  $\lambda$  530 nm dengan spektrofotometer. Serapan larutan uji dibandingkan dengan serapan serangkaian larutan standar yang diketahui kadarnya.

### 3.6.1 Bahan

Homogenat hati, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (*thiobarbituric acid*/ TBA) 0,67 %, larutan standar tetraetoksipropan (standar malondialdehid/ MDA) 80.000 kali pengenceran (1,5 nmol/60 uL, *molar extinction* :  $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}/\text{mmol}$  (Mercks<sup>®</sup>)), es dan akuades.

### 3.6.2 Alat

Mikropipet beserta tip berbagai ukuran, mikrotube, alat gelas, sentrifuse, vortex, spektrofotometer, penangas air suhu 95-100 °C dan timer.

### 3.6.3 Cara kerja

Homogenat/ standar MDA (400uL) ditambahkan TCA 20% (200uL). Campuran divorteks sehingga terlihat campuran menjadi keruh. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan untuk pemeriksaan selanjutnya, sedangkan peletnya dibuang. Supernatan ditambah dengan TBA 0,67% (400uL) dan kemudian dilakukan pemanasan di dalam penangas air suhu 95-100 °C selama 10 menit. Larutan kemudian didinginkan dengan merendamnya di dalam air es. Setelah dingin, larutan dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Masing-masing sampel dilakukan dua kali pengukuran (duplo).

## 3.7 Pengukuran Kadar Glutation (GSH) Homogenat Hati (metode Ellman)

Glutation jika direaksikan dengan pereaksi ditiobisnitrobenzoat (DTNB) akan menghasilkan senyawa berwarna kuning yang memberikan serapan pada  $\lambda$  412 nm. Serapan larutan uji dibandingkan dengan serapan serangkaian larutan standar GSH yang diketahui kadarnya.

### 3.7.1 Bahan

Homogenat hati, larutan asam trikloroasetat (TCA) 5%, reagen asam ditiobisnitrobenzoat (DTNB/ reagen Ellman) 39,6 mg dalam 10 mL larutan dapar fosfat/ PBS 0,1M pH 7,0, standar larutan glutacion 2 mg/mL dalam PBS 0,1M pH 8,0 (Merck<sup>®</sup>), larutan dapar fosfat/ PBS 0,1M pH 8,0.

### 3.7.2 Alat

Mikrotube, alat gelas, sentrifuse, *vortex*, neraca analitik (Sartorius), mikropipet berbagai ukuran beserta tip, spektrofotometer dan *stopwatch*.

### 3.7.3 Cara kerja

Sebanyak 50 uL homogenat/standar ditambah 200 uL larutan TCA 5 %. Campuran divortex sampai keruh kemudian ditambah PBS 0,1M pH 8,0 sampai volume menjadi 2 mL. Campuran divortex lagi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan untuk pemeriksaan selanjutnya, sedangkan peletnya dibuang. Sebanyak 1 mL dari supernatan diambil dan ditambahkan 12,5 uL DNTB. Campuran ini didiamkan selama 45 menit. Sisa larutan dijadikan blanko. Masing-masing sampel dilakukan dua kali pengukuran (duplo). Serapan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

## 3.8 Isolasi Protein

Isolasi protein untuk *western blot* dilakukan dengan menggunakan kit dan protokol dari TriPure<sup>®</sup>.

### 3.8.1 Bahan

Jaringan hati (50-100mg), TriPure<sup>®</sup> *Isolation Reagent*, CHCl<sub>3</sub>, isopropanol, fenol, etanol, guanidin HCl dalam etanol, SDS 1%.

### 3.8.2 Alat

Tabung mikro 1,5mL, mikropipet berbagai ukuran beserta tip, neraca analitik (Sartorius), *homogenizer* beserta mortar, sentrifuse berpendingin, *freezer* dan *hairdryer*.

### 3.8.3 Cara kerja

Sebanyak 50-100mg jaringan hati dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu ditambahkan 1 mL TriPure<sup>®</sup> *Isolation Reagent* dan dihomogenisasi. Setelah itu homogenat diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25°C untuk memastikan

disosiasi sempurna kompleks nukleoprotein. Setelah diinkubasi homogenat ditambahkan 0,2 mL  $\text{CHCl}_3$  dan dikocok kuat selama 15 detik. Lalu diinkubasi lagi selama 2-15 menit pada suhu 15-25°C. Untuk memisahkan protein, setelah diinkubasi homogenat disentrifuge 12000 g selama 15 menit pada suhu 2-8°C. Pada tahap ini dalam mikrotube terlihat 3 fase: fase air tidak berwarna di bagian atas mengandung RNA sedangkan interfase dan fase organik berwarna merah di bagian bawah mengandung DNA dan protein.

Karena DNA dan protein tercampur pada interfase dan fase organik, maka keduanya harus dipisahkan dengan mempresipitasi DNA. DNA dipresipitasi dengan menambahkan 0,3 mL EtOH 100%, kemudian dibalik-balik beberapa kali untuk mencampur. Lalu inkubasi pada suhu 15-25°C selama 2-3 menit dan sentrifugasi 2000 g selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan mengandung protein, fenol dan EtOH dan dapat disimpan pada suhu 2-8°C.

Selanjutnya protein dipisahkan dari fenol dan EtOH dengan cara dipresipitasi. Sebanyak 1,5 mL isopropanol ditambahkan ke supernatan fenol-EtOH dan dibalik-balik beberapa kali. Kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25°C untuk mempresipitasi protein. Untuk memisahkan protein (yang berupa presipitat) sampel disentrifugasi 12000 g selama 10 menit pada suhu 2-8°C dan supernatan dibuang.

Setelah dipisahkan, selanjutnya presipitat protein dicuci. Pelet protein diresuspensi dengan 2 mL 0,3M guanidin HCl dalam EtOH 95%. Lalu sampel diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25°C. Kemudian disentrifugasi 7500 g selama 5 menit pada suhu 2-8°C dan supernatan dibuang. Pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali.

Presipitat protein yang telah dicuci 3 kali kemudian ditambahkan 2 mL EtOH 100% lalu divorteks. Lalu diinkubasi 20 menit pada suhu 15-25°C dan disentrifuge 7500 g selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dibuang, sedangkan kelebihan EtOH dibuang dengan *air-drying*. Pelet protein dilarutkan dengan menambahkan SDS 1% dan memipet beberapa kali. Pelet yang sudah dilarutkan kemudian disentrifugasi 10000 g selama 10 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan yang terbentuk mengandung isolat protein dan dapat disimpan pada

suhu 4°C. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan mengukur serapannya pada  $\lambda$  280 nm dan membandingkannya terhadap standar.

### 3.9 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan SDS-PAGE sesuai metode Laemmli.

#### 3.9.1 Bahan

Isolat protein, akrilamid/ bisakrilamid 30/ 1, tris HCl 1,5M pH 8,6, tris HCl 0,5M pH 6,8, aquabides, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfate*) 10%, TEMED, dapar sampel,  $\beta$ -merkaptioethanol dan dapar elektroda 1x.

#### 3.9.2 Alat

Kit elektroforesis Biorad®, *power supply*, mikropipet berbagai ukuran serta tip, mikrotube, *vortex*, sentrifuse dan penangas air.

#### 3.9.3 Cara kerja

Kit elektroforesis disusun, lalu campuran untuk membuat gel dipersiapkan. Gel terdiri atas dua lapis yaitu gel pemisah di bawah dan gel pemampat di atas. Gel pemisah dibuat dengan mencampur 9 mL akrilamid/ bisakrilamid, 6,8 mL Tris HCl 1,5M pH 8,6, 10,4 mL aquabides, 269  $\mu$ L SDS 10%, 200  $\mu$ L APS 10% dan 20  $\mu$ L TEMED. Kemudian campuran gel pemisah dituang ke pelat kaca elektroforesis sampai kurang lebih  $\frac{3}{4}$  nya dan dibiarkan mengeras. Selanjutnya dibuat campuran gel pemampat dengan mencampur 6,1 mL akrilamid/ bisakrilamid, 4 mL Tris HCl 0,5M pH 6,8, 9,3 mL aquabides, 170  $\mu$ L SDS 10%, 150  $\mu$ L APS 10% dan 15  $\mu$ L TEMED. Campuran ini kemudian dituang ke pelat kaca elektroforesis sampai penuh dan *comb* dipasang untuk membentuk sumur.

Sampel berupa isolat protein disiapkan untuk elektroforesis. Volume sampel diambil dengan jumlah tertentu sehingga jumlah protein yang diambil adalah 40  $\mu$ g. Sampel dicampur dengan dapar sampel dan  $\beta$ -merkaptioetanol. Perbandingan dapar sampel dengan  $\beta$ -merkaptioetanol adalah 1:19. Lalu sampel divorteks dan sentrifugasi secukupnya. Selanjutnya campuran sampel dipanaskan

Universitas Indonesia

pada suhu 95-100°C selama 3-5 menit. Sampel ini kemudian dimasukan ke sumur elektroforesis dan elektroforesis dijalankan pada tegangan 90 V selama kurang lebih 4 jam. Setelah selesai gel siap untuk *Western Blot*.

### 3.10 *Western Blot*

#### 3.10.1 Bahan

Membran nitroselulosa, kertas saring, buffer Towbin, gel hasil elektroforesis, larutan *ponceau red* 10%, aquades, susu skim 5%, PBST-20 pH 7,2, antibodi primer (anti HIF, *Santa-Cruz Biotechnology*) pengenceran 1/500, antibodi sekunder (anti IgG mouse) pengenceran 1/1000, *aminoethyl carbazole* (AEC), aseton, buffer asetat 50mM pH 5,0 dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

#### 3.10.2 Alat

*Trans-blot Semi Dry Transfer Cell* (Biorad®), *power supply*, inkubator, mikrotube dan mikropipet beserta tip.

#### 3.10.3 Cara kerja

Kertas saring beserta membran nitroselulosa direndam dalam buffer transfer (buffer Towbin) selama 15 menit. Siapkan gel hasil elektroforesis. Setelah 15 menit, kertas saring, membran nitroselulosa dan gel hasil elektroforesis diletakkan secara *sandwich* di dalam alat *Trans-blot Semi Dry Transfer Cell* (Biorad®), dengan urutan: 3 lembar kertas saring, membran nitroselulosa, gel hasil elektroforesis dan 3 lembar kertas saring. Antar tiap lapisan dipastikan tidak ada gelembung udara. Setelah selesai disusun, alat *Transblot* disambungkan ke *power supply* dan dijalankan selama 2,5 jam pada tegangan 25 V.

Setelah 2,5 jam membran nitroselulosa dikeluarkan dari alat *Transblot* dan direndam dalam larutan *ponceau red* untuk melihat hasil *blotting*. Marker ditandai dengan pensil. Lalu membran dibilas dengan aquades untuk membersihkannya dari *ponceau red*. Untuk *blocking*, membran direndam susu skim 5% selama 2 jam pada suhu 37°C. Atau dapat juga diinkubasi pada suhu 4°C semalaman. Setelah *blocking* membran dicuci dengan PBST-20 pH 7,2 sebanyak 3 kali. Masing-masing pencucian selama 5 menit. Setelah itu membran direndam dalam

antibodi primer dengan pengenceran 1/500 pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah 2 jam membran dicuci lagi 3 kali lalu direndam dalam antibodi sekunder dengan pengenceran 1/1000 selama 1,5 jam pada suhu 37°C.

Selanjutnya adalah pewarnaan menggunakan AEC. AEC berupa tablet dan harus dilarutkan dahulu dalam 2,5 mL aseton. Kemudian ditambahkan buffer asetat sebanyak 47,5 mL dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 25 µL. Campuran ini digunakan untuk pewarnaan membran. Membran direndam dalam campuran ini sampai terlihat warna yang muncul dan didokumentasikan.



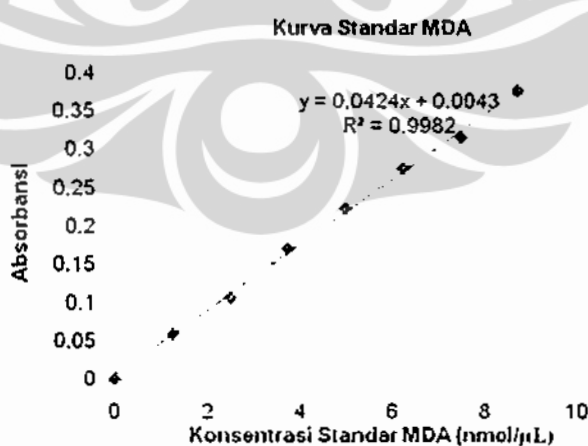


## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian hipoksia pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Induksi hipoksia sistemik pada tikus dilakukan dengan memasukkan tikus ke dalam sungkup hipoksia. Selanjutnya sungkup hipoksia dihubungkan dengan tangki gas yang mengandung campuran 10% oksigen dan 90% nitrogen. Penelitian ini merupakan sebagian dari proyek penelitian dengan tema hipoksia. Kondisi hipoksia pada hewan coba dibuktikan melalui analisis gas darah (data tidak ditampilkan). Terdapat 5 kelompok perlakuan yakni kelompok kontrol, kelompok hipoksia 1 hari, 3 hari, 7 hari dan 14 hari. Setelah perlakuan, tikus dikorbankan dan hatinya diambil. Sampel berupa homogenat hati seberat 100 mg yang dilarutkan dalam PBS pH 7,4 0,1M. Untuk mengetahui terjadinya stres oksidatif, dilakukan pengukuran kadar MDA dan kadar GSH. Untuk memperlihatkan adanya hipoksia, dilakukan pemeriksaan *Western Blot*.

### 4.1 Kadar Malondialdehid (MDA) jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik

Perhitungan kadar malondialdehid (MDA) dilakukan duplo untuk tiap sampel. Pada setiap kali pemeriksaan dilakukan pembuatan kurva standar MDA. Kurva standar MDA ditampilkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kurva standar malondialdehid (MDA)

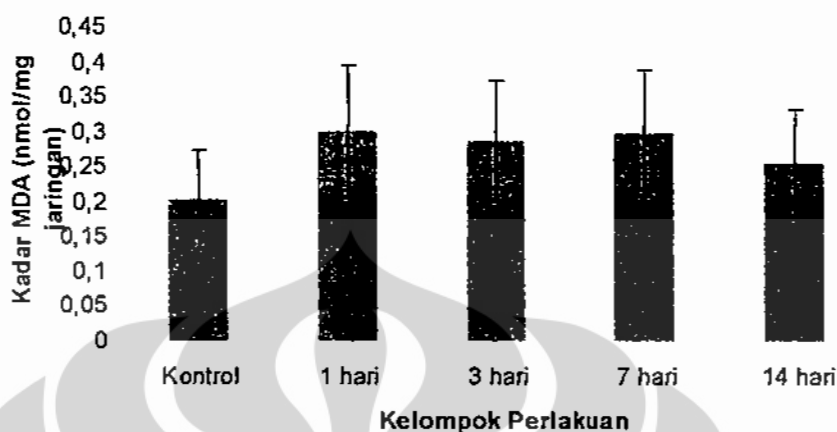
Hasil kemudian dirata-ratakan untuk tiap sampel yang sama dan dengan menggunakan kurva standar dilakukan penghitungan kadar MDA. Penghitungan ini kemudian dikoreksi terhadap faktor pengenceran pada masing-masing sampel. Dari perhitungan tersebut didapatkan sebaran nilai pada masing-masing kondisi normoksia, hipoksia 1 hari, hipoksia 3 hari, hipoksia 7 hari dan hipoksia 14 hari. (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Kadar MDA jaringan hati tikus (nmol / mg jaringan) kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik.

Perlakuan	Kadar MDA (nmol/mg jaringan)	Mean±SE
Kontrol (normoksia)	0.0981	0,204±0,06
	0.4676	
	0.1448	
	0.0924	
	0.2219	
Hipoksia 1 hari	0.6409	0,301±0,09
	0.1791	
	0.1764	
	0.1418	
	0.3682	
Hipoksia 3 hari	0.4260	0,289±0,08
	0.0549	
	0.3265	
	0.5088	
	0.1312	
Hipoksia 7 hari	0.5767	0,300±0,09
	0.2130	
	0.3637	
	0.0279	
	0.3163	
Hipoksia 14 hari	0.5164	0,254±0,07
	0.0536	
	0.2473	
	0.3055	
	0.1518	

Pada pengukuran MDA jaringan hati tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara kadar MDA kelompok normoksia dengan kelompok hipoksia 1 hari, 3 hari, 7 hari dan 14 hari. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 4.2 di bawah ini:

### Kadar MDA Jaringan Hati



Gambar 4.2. Kadar MDA jaringan hati kelompok tikus kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan uji Saphiro-Wilk, didapat data bahwa kadar jaringan MDA hati berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Karena data berdistribusi normal maka analisis statistik parametrik dapat dilakukan. Analisis parametrik yang digunakan adalah ANOVA dan didapat hasil tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan ( $p > 0,05$ ). Meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna tetapi Gambar 4.2 memperlihatkan bahwa kadar MDA pada kelompok hipoksia menunjukkan kadar yang lebih tinggi pada semua kelompok dibandingkan dengan kelompok normoksia. Peningkatan kadar MDA ini cenderung menetap sampai pada hari ke-14 hipoksia.

MDA merupakan produk akhir peroksidasi lipid yang menggambarkan aktivitas ROS. Jika peningkatan ROS yang timbul akibat hambatan aliran elektron di mitokondria dalam kondisi hipoksia masih dapat dinetralisir oleh anti oksidan, maka ROS tidak berpotensi untuk merusak makromolekul lain seperti lipid<sup>(8)</sup>.

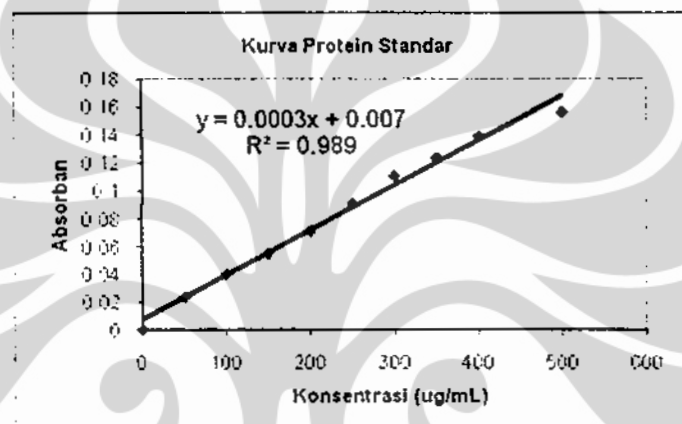
Peningkatan kadar MDA yang tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna menggambarkan bahwa ROS dapat ditanggulangi oleh sistem antioksidan yang terdapat di dalam jaringan hati. Hati merupakan jaringan yang mengandung antioksidan endogen dalam kadar lebih tinggi dibandingkan jaringan lainnya<sup>(8)</sup>.

#### 4.2 Kadar Glutation (GSH) jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik

Penetapan kadar glutatation dilakukan berdasarkan protein jaringan, oleh karena itu dilakukan pemeriksaan kadar protein jaringan hati.

##### Perhitungan kadar protein jaringan hati

Perhitungan protein jaringan dilakukan pada tiap sampel berdasarkan kurva standar dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) dengan kadar 0,2; 0,4; 0,6 dan 1 mg/mL (Gambar 4.3).



Gambar 4.3. Kurva standar protein *bovine serum albumin* (BSA)

Dari persamaan yang didapat dan setelah dikoreksi dengan pengenceran yang dilakukan, didapat kadar protein jaringan hati (mg/mg jaringan) pada masing-masing sampel seperti Tabel 4.2 berikut ini:

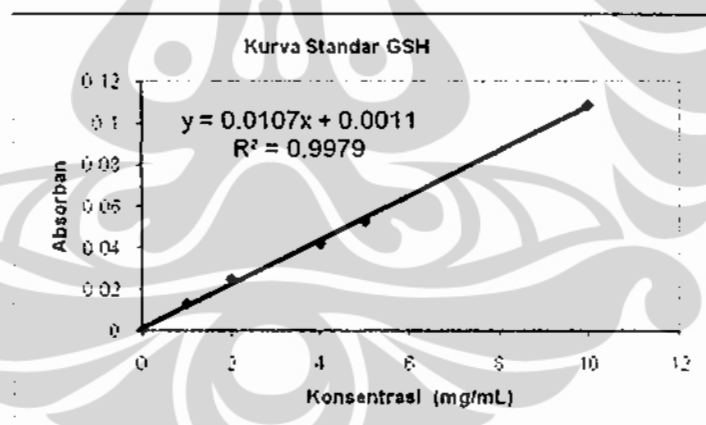
Tabel 4.2. Kadar protein jaringan hati tikus kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik (mg/mg jaringan hati)

Kelompok Perlakuan	Kadar protein (mg/mg jaringan)	Mean $\pm$ SE
Kontrol (normoksia)	0.1979	0,251 $\pm$ 0,03
	0.1856	
	0.2041	
	0.3795	
	0.2913	
Hipoksia 1 hari	0.2646	0,248 $\pm$ 0,01
	0.2708	
	0.2503	
	0.1908	

	0.2636	
Hipoksia 3 hari	0.3159 0.2338 0.1692 0.3641 0.1908	0,254±0,03
Hipoksia 7 hari	0.2246 0.2636 0.3067 0.2574 0.2369	0,257±0,01
Hipoksia 14 hari	0.5333 0.4287 0.7015 0.6195 1.4031	0,737±0,17

#### Perhitungan kadar GSH

Perhitungan kadar glutation (GSH) dilakukan duplo untuk tiap sampel. Setiap melakukan pemeriksaan GSH dibuat kurva standar GSH. Dengan mempergunakan kurva kadar standar GSH dilakukan perhitungan kadar GSH. Kurva standar GSH ditampilkan pada Gambar 4.4



Gambar 4.4. Kurva standar glutation (GSH)

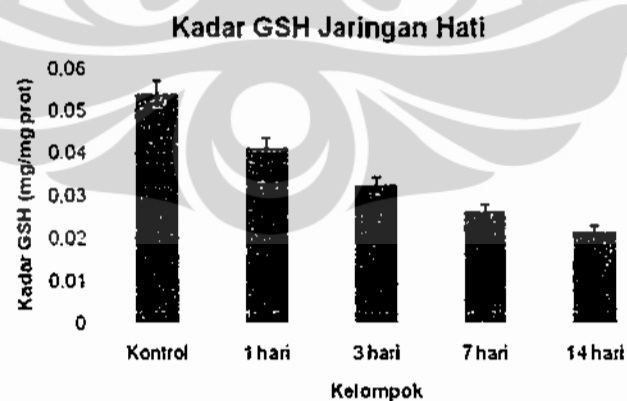
Hasil perhitungan ini kemudian dikoreksi berdasarkan pengenceran yang dilakukan dan kemudian dihitung kadarnya per miligram protein. Dari perhitungan tersebut didapatkan sebaran nilai yang dapat dilihat pada tabel 4.3 berikut ini:

Universitas Indonesia

Tabel 4.3. Kadar GSH jaringan hati tikus (mg/ mg protein) kelompok kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik

Perlakuan	Kadar GSH (mg/mg protein)	Mean±SE
Kontrol (normoksia)	0.059	0,054±0,001
	0.055	
	0.052	
	0.051	
	0.054	
Hipoksia 1 hari	0.047	0,041±0,002
	0.049	
	0.039	
	0.039	
	0.033	
Hipoksia 3 hari	0.034	0,032±0,001
	0.036	
	0.034	
	0.031	
	0.028	
Hipoksia 7 hari	0.021	0,026±0,002
	0.028	
	0.029	
	0.032	
	0.023	
Hipoksia 14 hari	0.020	0,021±0,001
	0.023	
	0.024	
	0.025	
	0.017	

Pada pengukuran kadar GSH jaringan hati didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan hipoksia 1, 3, 7 dan 14 hari dengan kelompok kontrol (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Kadar GSH jaringan hati kelompok tikus kontrol dan yang diinduksi hipoksia sistemik

Analisis statistik terhadap kadar GSH jaringan hati menggunakan uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Oleh karena data berdistribusi normal maka analisis yang dapat dilakukan adalah analisis parametrik. Uji parametrik yang digunakan adalah uji ANOVA untuk menguji kemaknaan semua kelompok perlakuan. Uji ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara semua kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana saja yang saling berbeda bermakna dilakukan uji LSD.

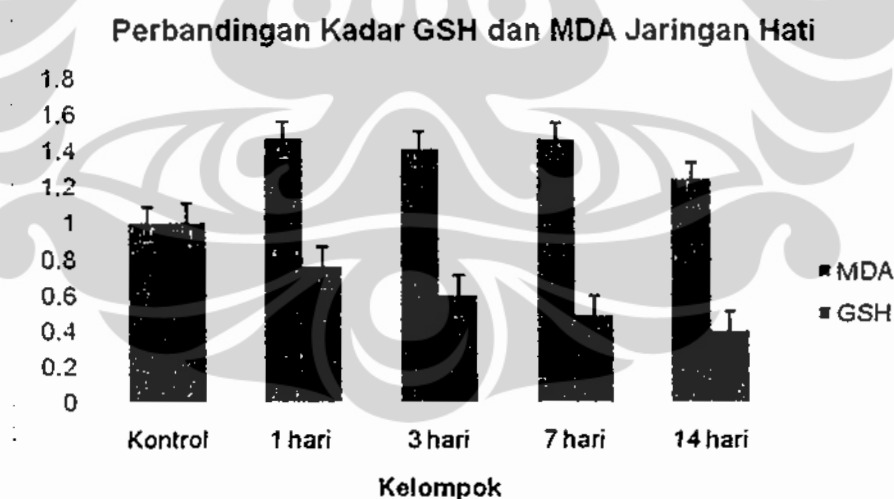
Glutation merupakan antioksidan endogen yang menjaga keseimbangan reaksi oksidasi-reduksi di dalam sel. Glutation tereduksi (GSH) dapat menetralkan ROS ( $H_2O_2$  atau peroksida organik) dengan bantuan enzim glutation peroksidase. Glutation bentuk reduksi mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan teroksidasi menjadi GSSG. Glutation teroksidasi (GSSG) dapat direduksi kembali membentuk GSH dengan bantuan enzim glutation reduktase. Reaksi reduksi ini memerlukan NADPH yang berasal dari jalur HMP Shunt, salah satu jalur metabolisme yang dialami glukosa<sup>(10)</sup>.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna kadar GSH antar kelompok perlakuan. Kadar GSH pada kelompok tikus hipoksia hari ke-1 menurun secara bermakna dibandingkan kontrol. Tampak bahwa pada awal hipoksia, GSH langsung terpakai untuk mengkompensasi ROS. Pada hipoksia 3 hari kadar GSH terlihat berkurang secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol dan hipoksia 1 hari. Hal ini menunjukkan bahwa GSH terpakai lebih banyak untuk menanggulangi ROS. Data ini juga menunjukkan bahwa sampai 3 hari hipoksia ROS yang terbentuk semakin banyak sehingga harus ditanggulangi dengan lebih banyak GSH. Pada hipoksia hari ke-7 kadar GSH makin berkurang secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol, hipoksia 1 hari dan 3 hari. Pada hipoksia hari ke-14 kadar GSH semakin berkurang dan berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol, hipoksia 1 hari, dan 3 hari namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok hipoksia 7 hari. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-14, hipoksia sudah berat sehingga banyak GSH yang digunakan untuk menanggulangi jumlah ROS yang sangat meningkat.

Secara keseluruhan, data yang didapat menunjukkan bahwa semakin lama tikus mengalami hipoksia sistemik, kadar GSH pada hati semakin berkurang untuk menanggulangi terbentuknya ROS. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lluis, *et al.* yang mendapatkan bahwa kadar GSH makin berkurang seiring dengan lamanya hipoksia <sup>(22)</sup>.

#### 4.3 Analisis Hubungan Antara Kadar MDA dan GSH

Kadar MDA jaringan hati antara kelompok perlakuan normoksia, 1 hari, 3 hari, 7 hari dan 14 hari tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dan cenderung konstan. MDA merupakan hasil akhir peroksidasi lipid yang menggambarkan aktivitas merusak ROS terhadap lipid. Kadar MDA yang konstan menunjukkan bahwa ROS dapat ditanggulangi oleh sistem antioksidan. Pada hipoksia hari pertama kadar GSH jaringan hati berkurang secara bermakna, sedangkan kadar MDA bertambah. Tampaknya pada hipoksia hari pertama jaringan hati tikus mengalami peningkatan pembentukan ROS, tetapi sel dapat menanggulangnya dengan GSH untuk menetralkan ROS sehingga meskipun terjadi peningkatan kadar MDA tetapi tidak bermakna. Pada Gambar 4.6 dapat dilihat grafik perbandingan antara kadar MDA dengan kadar GSH.



Gambar 4.6 Perbandingan kadar GSH dan MDA pada jaringan hati



Pada hipoksia hari ke-3 kadar GSH menurun dibandingkan kelompok kontrol dan hipoksia 1 hari, sedangkan kadar MDA relatif menurun sedikit dibandingkan hipoksia 1 hari tetapi tetap lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini menggambarkan bahwa antioksidan tetap digunakan untuk menanggulangi ROS yang berakibat kadar MDA yang merupakan produk dari ROS relatif tidak banyak berubah.

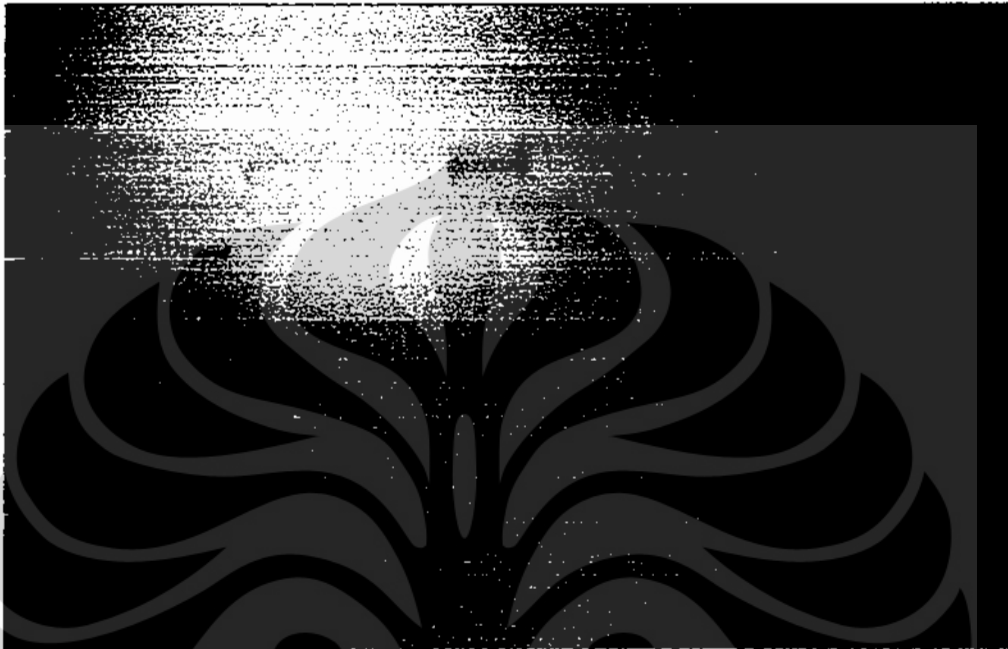
Pada hipoksia hari ke-7 kadar GSH semakin menurun sedangkan kadar MDA agak naik tetapi tidak signifikan. Pada keadaan hipoksia selama 7 hari ini tampaknya jaringan hati tikus memakai lebih banyak GSH untuk menanggulangi meningkatnya ROS, sehingga kadar MDA hanya sedikit meningkat dan menandakan ROS masih dapat ditanggulangi oleh sel. Pada perlakuan hipoksia 14 hari kadar GSH sudah sangat sedikit sehingga MDA berkurang tidak signifikan dibandingkan perlakuan 7 hari hipoksia.

Untuk mengetahui adanya korelasi antara kadar GSH dengan kadar MDA jaringan hati, dilakukan uji korelasi. Karena kedua data berdistribusi normal, maka uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi Pearson. Dari hasil uji korelasi Pearson didapatkan koefisien korelasi sebesar  $-0,149$ . Angka ini menunjukkan tidak ada korelasi yang bermakna antara kadar GSH dengan kadar MDA. Meskipun secara statistik tidak ada korelasi yang bermakna antara kadar MDA dengan kadar GSH, hasil yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 menunjukkan bahwa stabilnya kadar MDA ada hubungannya dengan berkurangnya kadar GSH. Kadar MDA tetap cenderung sama karena ROS yang timbul dinetralkan oleh GSH dan sampai pada hari ke-14 GSH hanya tinggal sedikit. Selain itu GSH bukan satu-satunya antioksidan endogen di dalam sel dan MDA pun bukan satu-satunya produk dari kerusakan yang ditimbulkan oleh ROS. Oleh karena itu penurunan kadar GSH tidak dapat langsung dihubungkan dengan perubahan kadar MDA karena masih ada faktor lain yang mempengaruhinya.

Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa hipotesis penelitian diterima karena hasil kadar GSH dan MDA menunjukkan bahwa organ hati mengalami peningkatan stres oksidatif seiring dengan lamanya hipoksia.

#### 4.4 Western Blot HIF 1- $\alpha$

Data *Western blot* menunjukkan adanya ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  pada kontrol (normoksia), hipoksia 1 hari dan 3 hari.



Gambar 4.7 Hasil *Western Blot* dengan antibodi monoklonal anti HIF 1- $\alpha$  pada sampel jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. M: marker, K: kontrol, 1: hipoksia 1 hari, 3: hipoksia 3 hari, 7: hipoksia 7 hari, 14: hipoksia 14 hari, BSA: *Bovine Serum Albumin*

Antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah antibodi monoklonal yang diperoleh dari Santa Cruz. Antibodi ini merupakan antibodi anti HIF 1- $\alpha$  mencit terhadap protein rekombinan yang sesuai dengan asam amino 432-528 HIF 1- $\alpha$  manusia. Akan tetapi antibodi ini direkomendasikan untuk deteksi HIF 1- $\alpha$  padamanusia, tikus dan babi. HIF 1- $\alpha$  yang dikenali antibodi tersebut besarnya adalah 132 kDa. Pada Gambar 4.7 tampak bahwa antibodi anti HIF 1- $\alpha$  dapat mengenali pita di atas 116 kDa yang mungkin adalah HIF 1- $\alpha$  dari tikus. Selain itu terlihat pula pita dengan ukuran kurang lebih 66 kDa. Pita ini kemungkinan merupakan pita dari protein non spesifik yang dapat dikenali juga oleh antibodi anti HIF 1- $\alpha$ .

Dari hasil *Western Blot* terlihat adanya protein HIF 1- $\alpha$  pada tikus normoksia, hipoksia 1 hari dan hipoksia 3 hari. Nilai densitas masing-masing

adalah: K=125,46; 1=116,56; 3=136,86; 7=0; 14=0. Pada kondisi normoksia HIF 1- $\alpha$  didegradasi melalui sistem ubiquitin proteasom. Adanya bercak HIF 1- $\alpha$  pada kontrol mungkin dapat disebabkan oleh karena menurut Wenger (2002), selain mekanisme stabilisasi HIF-1 $\alpha$  melalui hipoksia, banyak *growth factor* dan sitokin yang diketahui dapat menstabilisasi HIF-1 $\alpha$  pada keadaan normal. Dan juga menurut Nikinmaa *et al.* kondisi redoks sel turut mempengaruhi kestabilan HIF 1- $\alpha$  <sup>(23)</sup>. Cangul mendapatkan bahwa dari 20 sampel jaringan hati normal, terdeteksi adanya HIF 1- $\alpha$  di 18 sampel hanya 2 sampel yang dilaporkan tidak mengekspresikan HIF 1- $\alpha$  <sup>(17)</sup>. Jadi pada kondisi normoksia (kadar oksigen normal) tidak tertutup kemungkinan HIF 1- $\alpha$  dapat menjadi stabil, karena ada faktor lain yang mempengaruhi termasuk juga ROS <sup>(24)</sup>.

Ada beberapa kendala pada pada pengerjaan *Western Blot* ini, diantaranya adalah sewaktu mentransfer pita protein dari gel hasil elektroforesis ke membran nitroselulosa (*blotting*). *Blotting* dilakukan dengan alat *Trans-blot Semi Dry Transfer Cell* yang diatur pada tegangan 25 V. Akan tetapi sewaktu pengerjaan, tegangan pada alat *Trans-blot* tidak pernah melebihi 7 V. Hal ini kemungkinan disebabkan kurangnya buffer transfer yang diberikan sewaktu pengerjaan *blotting* yang menyebabkan kurangnya ion yang dibutuhkan untuk mentransfer protein dari gel. Akibatnya *blotting* tidak maksimal dan juga tidak merata. Banyaknya protein yang tertransfer tidak sama banyak antara sampel yang satu dengan yang lain. Hal ini menyebabkan tidak terlihatnya pita pada perlakuan hipoksia 7 dan 14 hari pada hasil *Western Blot*. Setelah dilakukan *blotting*, membran nitroselulosa diwarnai *ponceau red* 10% dan terlihat pada lajur kontrol, 1 hari dan 3 hari protein tertransfer secara baik, sedangkan pada lajur 7 dan 14 hari hasil transfer terlihat tipis (*Gambar 4.8*)



Gambar 4.8 Pewarnaan *ponceau red* 10% setelah *blotting*

Setelah diberikan antibodi ternyata tidak terlihat ada pita pada lajur 7 dan 14 hari. Hal ini terjadi bukan karena tidak ada HIF 1- $\alpha$  pada lajur tersebut, tetapi karena memang tidak banyak protein yang tetransfer pada lajur tersebut. Hal lain yang dapat menyebabkan hasil yang tidak merata adalah jumlah protein yang tidak sama sewaktu elektroforesis. Sebelum dilakukan elektroforesis, volume sampel dihitung terlebih dahulu agar protein yang diambil adalah 40  $\mu\text{g}$ . Tetapi sewaktu memasukkan sampel ke dalam sumur kemungkinan ada sedikit yang terbuang sehingga jumlah protein yang seharusnya 40  $\mu\text{g}$  menjadi berkurang.

Dari hasil *Western Blot* dapat dikatakan bahwa hipotesis penelitian diterima. Hasil *Western Blot* memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi HIF 1- $\alpha$  dari kontrol (nilai densitas 125,46) dibandingkan dengan hipoksia 3 hari (nilai densitas 136,86).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Kesimpulan**

6.1.1 Stres oksidatif meningkat secara bertahap seiring dengan lamanya hipoksia dan dibuktikan dengan:

- a) Kadar MDA pada perlakuan hipoksia lebih tinggi daripada kontrol (normoksia).
- b) Kadar GSH menurun secara bertahap seiring dengan lamanya hipoksia.

6.1.2 Tidak ada hubungan bermakna antara kadar GSH dengan MDA

6.1.3 Terjadinya hipoksia dapat dilihat dari hasil *Western Blot*.

#### **6.2 Saran**

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas antioksidan di hati pada keadaan hipoksia, antara lain: MnSOD, katalase dan glutathion peroksidase.

Universitas Indonesia

## DAFTAR PUSTAKA

1. Schuler, B., *et al.*. HIF-1 and the Adaptation of Man to High Altitude. *Sportmedizin und Sporttraumatologie*. 2005. 53: 2; 82-87
2. Lee, J.W., *et al.*. Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ): Its Protein Stability and Biological Functions. *Exp. Mol. Med.* 2004. Vol. 36:1; 1-12
3. Wenger, R.. Cellular Adaptation to Hypoxia: O<sub>2</sub>-Sensing Protein Hydroxylases, Hypoxia-Inducible Transcription Factors, and O<sub>2</sub>-Regulated Gene Expression. *FASEB*. 2002. 16: 1151-62
4. Zagorska, A., *et al.*. HIF-1: The Knowns and Unknowns of Hypoxia Sensing. *Acta Biochimica Polonica*. 2004. 51(3): 563-78
5. Schumaker, P.T., Guzy, R.D.. Oxygen Sensing by Mitochondria at Complex III: The Paradox of Increased ROS during Hypoxia. *Experimental Physiology*. 2006. 91: 807-19
6. Giaccia, A.J., *et al.*. The Biology of Hypoxia: The Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function, and Disease. *Genes & Development*. 2004. 18: 2183-94
7. Giordano, F.J.. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia and Heart Failure. *J. Clin. Invest.* 2005. 115: 500-8
8. Halliwell, B., *et al.*. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press. London. 2007
9. Wills, E.D.. Evaluation of Lipid Peroxidation in Lipids & Biological Membranes. In: Snell, K., Mullock, B., editors. *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL. Oxford. 1987

Universitas Indonesia

10. Haddad, J.J.. Oxygen-sensing Mechanisms and The Regulation of Redox-responsive Transcription Factors in Development and Pathophysiology. *Respir Res.* 2002. 3: 26-53
11. Mayes, P.A.. Glicolysis and Piruvat Oxidation In: Murray, R.K., Granner, D.K.M., Rodwell, V.W., editors. *Harper's Biochemistry*, 26<sup>th</sup> ed. McGraw-Hills. New York. 2003
12. Taylor, C.T., Pouyssegur, J.P., Oxygen, Hypoxia and Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. 1113: 87-94
13. Vaupel, P., *et al.*. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory mechanism, and Cellular Response. *Oncologist.* 2004. 9: suppl 5; 4-9
14. Storey, K.B., Storey, J.M.. Oxygen Limitation and Metabolic Rate Depression. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004
15. Hermes-Lima, M.. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radical. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* John-Wiley & Sons. New Jersey. 2004
16. Qun, C., *et al.*. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003. 278(38): 36027-31
17. Cangul, H.. Hipoxia Upregulates The Expression of The NDRG1 Gene Leading to Its Overexpression in Various Human Cancer. *BMC Genetics.* 2004. 5:27
18. Dufour, J.F., *et al.*. *Signaling Pathways in Liver Disease.* Springer-Berlin. Heidelberg. 2005. Chapter 26
19. Towbin, H., *et al.*. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. 76(9): 4350-4

20. Renart, J., *et al.*. Transfer of Proteins From Gels to Diazobenzoyloxymethyl-Paper and Detection With Antisera: A Method For Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. 76(7): 3116-20
21. Hanafiah, K.A.. *Rancangan Percobaan: Teori & Aplikasi*. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta. 2005
22. Lluís, J.M. *et al.*. Critical Role of Mitochondrial Glutathione in the Survival of Hepatocytes During Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. 280(5): 3224-32
23. Nikinmaa, M., *et al.*. Redox State Regulates HIF 1- $\alpha$  and Its DNA Binding and Phosphorylation in Salmonid Cells. *Journal of Cell Science*. 2004. 117(15): 3201-6
24. Bonello, S., *et al.*. Reactive Oxygen Species Activate the HIF 1- $\alpha$  Promoter Via a Functional NF $\kappa$ B Site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27: 755-61
25. Chandel, S.N., *et al.*. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor 1- $\alpha$  During Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000. 33: 25130-8
26. Carraway, M.S., *et al.*. Expression of Heme Oxygenase-1 in The Lung in Chronic Hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 2000. 278: L806-L12



Lampiran 1. Kadar protein dalam jaringan hati

Perlakuan	Berat jar(mg)	Abs	Kons(ug/mL)	Konsx200/1000 (mg/mL)
Kontrol	122	0.1095	318.607	63.721
	128	0.182	544.011	108.802
	134	0.1475	436.750	87.350
	136	0.1575	467.840	93.568
	122	0.112	326.380	65.276
Hipoksia 1 hari	118	0.115	335.707	67.141
	124	0.118	345.034	69.007
	118	0.135	397.887	79.577
	118	0.1195	349.697	69.939
	125	0.135	397.887	79.577
Hipoksia 3 hari	130	0.1315	387.005	77.401
	126	0.129	379.233	75.847
	133	0.136	400.996	80.199
	124	0.13	382.342	76.468
	117	0.1575	467.840	93.568
Hipoksia 7 hari	116	0.147	435.195	87.039
	130	0.135	397.887	79.577
	118	0.13	382.342	76.468
	129	0.131	385.451	77.090
	116	0.1415	418.096	83.619
Hipoksia 14 hari	123	0.143	422.759	84.552
	119	0.139	410.323	82.065
	120	0.131	385.451	77.090
	117	0.1315	387.005	77.401
	124	0.1455	430.532	86.106

Lampiran 2. Kadar MDA jaringan

Perlakuan	Serapan	Kadar hitung (nmol)	Berat jaringan	Kadar MDA (nmol/mg jaringan)
Kontrol	0,055	1,226	100	0,098
	0,249	5,845	100	0,467
	0,080	1,809	100	0,144
	0,052	1,154	100	0,092
	0,120	2,773	100	0,221
Hipoksia 1 hari	0,352	8,011	100	0,640
	0,098	2,238	100	0,179
	0,097	2,204	100	0,176
	0,078	1,772	100	0,141
	0,202	4,602	100	0,368
Hipoksia 3 hari	0,231	5,325	100	0,426
	0,031	0,686	100	0,054
	0,177	4,081	100	0,326
	0,275	6,30	100	0,508
	0,072	1,639	100	0,131
Hipoksia 7 hari	0,312	7,209	100	0,576
	0,116	2,662	100	0,213
	0,197	4,546	100	0,363
	0,017	0,348	100	0,027
	0,172	3,953	100	0,316
Hipoksia 14 hari	0,284	6,454	100	0,516
	0,029	0,670	100	0,053
	0,136	3,090	100	0,247
	0,168	3,818	100	0,305
	0,083	1,897	100	0,151

Lampiran 3. Kadar GSH jaringan

Perlakuan	Berat jar(mg)	Abs	Kons(ug/mL)	Kons GSH (ug/mg prot)	Kons GSH (ug/mg jar)
Kontrol	122	0.041	3.729	0.059	0.031
	128	0.065	5.973	0.055	0.047
	134	0.0495	4.524	0.052	0.034
	136	0.052	4.758	0.051	0.035
	122	0.039	3.542	0.054	0.029
Hipoksia 1 hari	118	0.035	3.168	0.047	0.027
	124	0.037	3.355	0.049	0.027
	118	0.034	3.074	0.039	0.026
	118	0.03	2.700	0.039	0.023
	125	0.0295	2.654	0.033	0.021
Hipoksia 3 hari	130	0.0295	2.654	0.034	0.020
	126	0.03	2.700	0.036	0.021
	133	0.0305	2.747	0.034	0.021
	124	0.0265	2.373	0.031	0.019
	117	0.029	2.607	0.028	0.022
Hipoksia 7 hari	116	0.021	1.859	0.021	0.016
	130	0.025	2.233	0.028	0.017
	118	0.025	2.233	0.029	0.019
	129	0.0275	2.467	0.032	0.019
	116	0.0215	1.906	0.023	0.016
Hipoksia 14 hari	123	0.0195	1.719	0.020	0.014
	119	0.0215	1.906	0.023	0.016
	120	0.0205	1.812	0.024	0.015
	117	0.0215	1.906	0.025	0.016
	124	0.0165	1.438	0.017	0.012

## Lampiran 3. Uji normalitas sampel

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar MDA (nmol/mg jar.)	.138	25	.200*	.941	25	.160

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GSH (mg/mg prot)	.142	25	.200*	.933	25	.099

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

## Lampiran 5. Uji parametrik kadar GSH

## Uji ANOVA:

## ANOVA

GSH (mg/mg prot)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	44.189	.000
Within Groups	.000	20	.000		
Total	.004	24			

## Uji LSD:

## Multiple Comparisons

GSH (mg/mg prot)

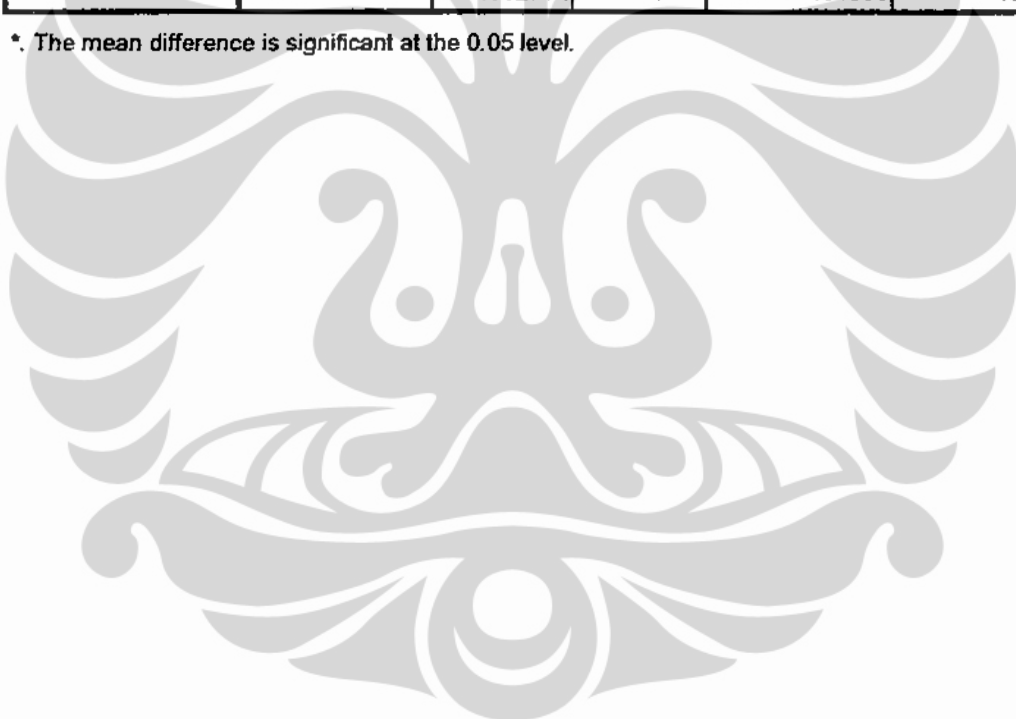
LSD

(I) Kel perlakuan	(J) Kel perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1 hari	.012800*	.002732	.000	.00710	.01850
	3 hari	.021600*	.002732	.000	.01590	.02730
	7 hari	.027600*	.002732	.000	.02190	.03330
	14 hari	.032400*	.002732	.000	.02670	.03810
1 hari	Kontrol	-.012800*	.002732	.000	-.01850	-.00710
	3 hari	.008800*	.002732	.004	.00310	.01450
	7 hari	.014800*	.002732	.000	.00910	.02050

Universitas Indonesia

	14 hari	.019600*	.002732	.000	.01390	.02530
3 hari	Kontrol	-.021600*	.002732	.000	-.02730	-.01590
	1 hari	-.008800*	.002732	.004	-.01450	-.00310
	7 hari	.006000*	.002732	.040	.00030	.01170
	14 hari	.010800*	.002732	.001	.00510	.01650
7 hari	Kontrol	-.027600*	.002732	.000	-.03330	-.02190
	1 hari	-.014800*	.002732	.000	-.02050	-.00910
	3 hari	-.006000*	.002732	.040	-.01170	-.00030
	14 hari	.004800	.002732	.094	-.00090	.01050
14 hari	Kontrol	-.032400*	.002732	.000	-.03810	-.02670
	1 hari	-.019600*	.002732	.000	-.02530	-.01390
	3 hari	-.010800*	.002732	.001	-.01650	-.00510
	7 hari	-.004800	.002732	.094	-.01050	.00090

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



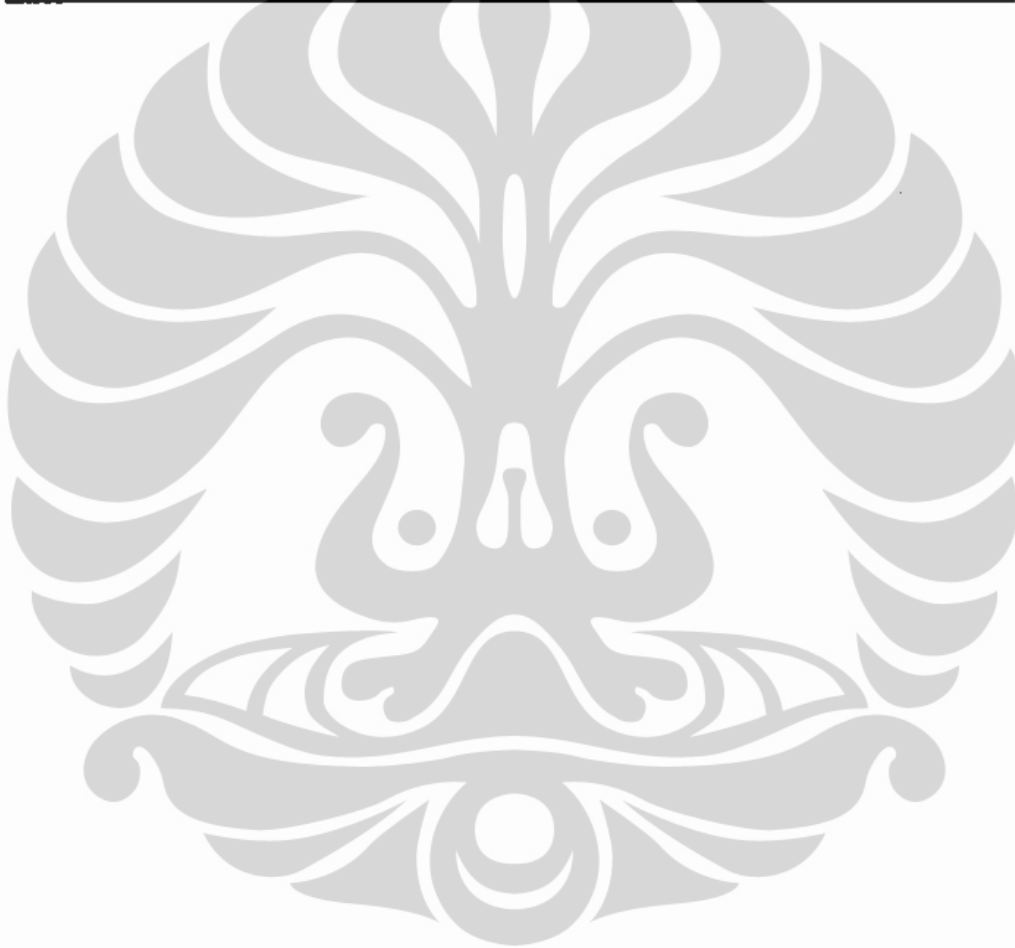
## Lampiran 6. Uji parametrik kadar MDA

Uji ANOVA:

## ANOVA

Kadar MDA (nmol/mg jar.)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.033	4	.008	.237	.914
Within Groups	.706	20	.035		
Total	.739	24			



## Lampiran 7. Uji korelasi

**Correlations**

		GSH (mg/mg prot)	MDA (nmol/mg jar)
GSH (mg/mg prot)	Pearson Correlation	1.000	-.149
	Sig. (2-tailed)		.479
	N	25.000	25
MDA (nmol/mg jar)	Pearson Correlation	-.149	1.000
	Sig. (2-tailed)	.479	
	N	25	25.000





DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.  
BADAN PENELITIAN DAN  
PENGEMBANGAN KESEHATAN



Jl. Percetakan Negara No. 29  
Jakarta 10560  
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012  
Telp. (021) 4261088

Faks. (021) 4243933  
E-mail : [sesban@litbang.depkes.go.id](mailto:sesban@litbang.depkes.go.id)  
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK UNTUK AMANDEMEN PROTOKOL  
(APPROVAL FOR AMANDMENT OF RESEARCH PROTOCOL)

Nomor: LB.03.02/KB/4783/08

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, menyatakan bahwa setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

**“ANALISIS REGULASI GEN SITOGLOBIN PADA KEADAAN HIPOKSIA SISTEMIK  
OLEH HIF-1 $\alpha$ ”**

*(Revisi protokol tanggal 14 Mei 2008)*

Disetujui amandemen protokol menjadi :

**“REGULASI EKSPRESI GEN SITOGLOBIN PADA KEADAAN HIPOKSIA OLEH  
HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR – 1 $\alpha$ ”**

yang menggunakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/  
Peneliti Utama:

***Dr. Sri Widia A. Jusman, MS***

Persetujuan amandemen protokol ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 9 Desember 2008

Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Badan Litbang Kesehatan,



*[Signature]*  
Prof. Dr. M. Sudomo



# HIF-1 $\alpha$ (H1 $\alpha$ 67): sc-53546

The Power to Question

## BACKGROUND

Cell growth and viability is compromised by oxygen deprivation (hypoxia). Hypoxia-inducible factors, including HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  (also designated Arnt 1), EPAS-1 (also designated HIF-2 $\alpha$ ) and HIF-3 $\alpha$ , induce glycolysis, erythropoiesis and angiogenesis in order to restore oxygen homeostasis. Hypoxia-inducible factors are members of the Per-Arnt-Sim (PAS) domain transcription factor family. In response to hypoxia, HIF-1 $\alpha$  is upregulated and forms a heterodimer with Arnt 1 to form the HIF-1 complex. The HIF-1 complex recognizes and binds to the hypoxia responsive element (HRE) of hypoxia-inducible genes, thereby activating transcription. Hypoxia-inducible expression of some genes such as Glut-1, p53, p21 or Bcl-2, is HIF-1 $\alpha$  dependent, whereas expression of others, such as p27, GADD 153 or HO-1, is HIF-1 $\alpha$  independent. EPAS-1 and HIF-3 $\alpha$  have also been shown to form heterodimeric complexes with Arnt 1 in response to hypoxia.

## REFERENCES

1. Wang, G.L., et al. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5510-5514.
2. Luo, G., et al. 1997. Molecular characterization of the murine HIF-1 $\alpha$  locus. *Gene Expr.* 6: 287-299.
3. Tian, H., et al. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11: 72-82.
4. Carmeliet, P., et al. 1998. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490.
5. Gu, Y.Z., et al. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third  $\alpha$ -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 $\alpha$ . *Gene Expr.* 7: 205-213.
6. Wood, S.M., et al. 1998. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ -subunit (HIF-1 $\alpha$ ). Characterization of HIF-1 $\alpha$ -dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* 273: 8360-8368.

## CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: HIF1A (human) mapping to 14q21-q24; Hif1a (mouse) mapping to 12 C3.

## SOURCE

HIF-1 $\alpha$  (H1 $\alpha$  67) is a mouse monoclonal antibody raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 432-528 of HIF-1 $\alpha$  of human origin.

## PRODUCT

Each vial contains 200  $\mu$ g IgG<sub>2b</sub> in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

## STORAGE

Store at 4° C. **\*\*DO NOT FREEZE\*\***. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

## APPLICATIONS

HIF-1 $\alpha$  (H1 $\alpha$  67) is recommended for detection of HIF-1 $\alpha$  of mouse, rat, human and pig origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1-2  $\mu$ g per 100-500  $\mu$ g of total protein (1 ml of cell lysate)), immunofluorescence and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

Suitable for use as control antibody for HIF-1 $\alpha$  siRNA (h): sc-35561, HIF-1 $\alpha$  siRNA (h2): sc-44225, HIF-1 $\alpha$  siRNA (m): sc-35562, HIF-1 $\alpha$  siRNA (m2): sc-44308 and HIF-1 $\alpha$  siRNA (r): sc-45919.

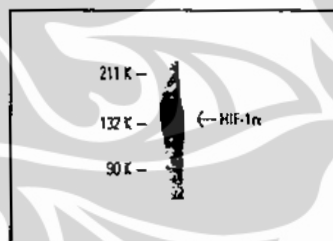
Molecular Weight of HIF-1 $\alpha$ : 132 kDa.

Positive Controls: HeLa + COCl<sub>2</sub> whole cell lysate: sc-24679, K-562 whole cell lysate: sc-2203 or HeLa whole cell lysate: sc-2200.

## RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 (dilution range: 1:2000-1:32,000) or Cruz Marker™ compatible goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010 (dilution range: 1:100-1:400) or goat anti-mouse IgG-TR: sc-2781 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941. 4) Immunohistochemistry: use ImmunoCruz™: sc-2050 or ABC: sc-2017 mouse IgG Staining Systems.

## DATA



HIF-1 $\alpha$  (H1 $\alpha$  67): sc-53546. Western blot analysis of HIF-1 $\alpha$  expression in CoCl<sub>2</sub> treated HeLa immunoprecipitated with HIF-1 $\alpha$  (H1 $\alpha$  67) sc-53546 and detected with HIF-1 $\alpha$  (H-206) sc-10790.

## RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

## PROTOCOLS

See our web site at [www.scbt.com](http://www.scbt.com) or our catalog for detailed protocols and support products.

## RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap : Abdul Halim Sadikin  
NPM : 6105012011  
Tempat/tanggal lahir : Bordeaux, 08 Oktober 1981  
Agama : Islam  
Alamat : Jl. Bendungan Hilir XIII No. 14

### Riwayat Pendidikan

SD : SDN Cideng 10 Pagi, tahun 1987-1993  
SMP : SMPN 72 Petojo, tahun 1993-1996  
SMU : SMUN 68 Salemba, tahun 1996-1999  
SI : Jurusan Biologi FMIPA UNJ, 1999-2005

Universitas Indonesia

# Stres Oksidatif Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik

Abdul Halim Sadikin, Sri Widia A. Jusman, Septelia Inawati Wanandi

Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas. Kedokteran,  
Universitas Indonesia  
Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat, Indonesia

## Abstrak

Keadaan hipoksia menyebabkan peningkatan *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) sebagai respon terhadap menurunnya kadar oksigen. Selain menyebabkan peningkatan HIF, hipoksia juga menyebabkan peningkatan pembentukan dan pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari dalam mitokondria yang kemudian akan meregulasi respons terhadap O<sub>2</sub> yang rendah. Akibat peningkatan pembentukan ROS, kemungkinan dapat terjadi stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan mengamati pengaruh hipoksia sistemik terhadap ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  dan stres oksidatif pada jaringan hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik selama 1, 3, 7 dan 14 hari yang dibandingkan dengan kelompok normoksia sebagai kontrol.

Induksi hipoksia sistemik dilakukan dengan memaparkan tikus jantan *Sprague-Dawley* terhadap lingkungan dengan oksigen 10% dan nitrogen 90% dalam sungkup hipoksia. Kadar protein, glutation (GSH) dan malondialdehid (MDA) diperiksa dari homogenat hati tikus. Kadar protein dihitung dengan mengukur serapan pada  $\lambda$  280 nm dan dibandingkan dengan serapan larutan standar *Bovine Serum Albumin*. Kadar malondialdehid (MDA) ditetapkan dengan metode Wills dan kadar glutation (GSH) diukur dengan metode Ellman. Analisis ekspresi gen HIF 1- $\alpha$  dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan menggunakan anti HIF 1- $\alpha$  sebagai antibodi primer, anti IgG mouse sebagai antibodi sekunder dan pewarnaan menggunakan *aminoethyl carbazole*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA hati meningkat mulai hari ke-1 hipoksia dan bertahan sampai 14 hari, walaupun tidak bermakna secara statistik. Kadar GSH hati menunjukkan penurunan yang bermakna seiring dengan lamanya hipoksia. Hasil *Western Blot* menunjukkan adanya HIF 1- $\alpha$  pada normoksia, hipoksia 1 hari dan 3 hari. Dapat disimpulkan bahwa terjadi stres oksidatif di jaringan hati seiring dengan lamanya hipoksia.

Kata kunci: Hipoksia sistemik, stres oksidatif, *Western Blot*, MDA GSH, HIF 1- $\alpha$

## Abstract

Hypoxia condition increases the level of hypoxia-inducible factor (HIF) as response to oxygen deprivation. Hypoxia also increases production and releases of reactive oxygen species (ROS) from mitochondria. Excessive production of ROS can lead to oxidative stress, due to its reactivity with macromolecules within cell, i.e lipid. The objective of this study is to observe the effects of induction of systemic hypoxia on expression of HIF 1- $\alpha$  gene and its relation oxidative stress in rat liver tissue.

The experiment was conducted on 25 male Sprague-Dawley rats, which were divided into 5 groups : normoxic, hypoxia for 1 day, 3 days, 7 days and 14 days. Induction of systemic hypoxia was carried by exposing the rats in a hypoxic chamber with environment 10% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. To asses the oxidative stress condition, malondialdehyde (MDA) and glutation (GSH) concentration in liver was measured using Wills' and Ellman's method, respectively. Expression of HIF 1- $\alpha$  gene was analyzed using Western Blot.

The result showed that MDA concentration is higher in all hypoxic group with no statistically significance difference. The GSH level decreased significantly until day 14. It seemed that oxidative stress occurred at day 14. HIF 1- $\alpha$  was expressed in normoxic condition, hypoxia day 1 and day 3. It was concluded that oxidative stress was more likely to occur at day 14 of hypoxia.

Keywords: hypoxia, oxidative stress, MDA, GSH, HIF 1- $\alpha$ , liver, Western Blot

### 1. Pendahuluan

Hipoksia adalah suatu keadaan dimana suplai oksigen tidak mencukupi untuk keperluan sel, jaringan atau organ. Keadaan hipoksia dapat disebabkan oleh berbagai faktor, antara lain tekanan parsial oksigen (pO<sub>2</sub>) yang rendah dalam darah arteri (*hypoxic hypoxia*), menurunnya kapasitas transport oksigen oleh Hb (*anemic hypoxia*), insufisiensi perfusi darah ke jaringan (*circulatory/ ischemic hypoxia*), penurunan kemampuan jaringan untuk menggunakan oksigen karena keracunan sel atau jaringan (*histotoxic/ cytotoxic hypoxia*) serta gangguan difusi oksigen (*diffusional hypoxia*) (Vaupel *et al.*, 2004).

Keadaan hipoksia menyebabkan meningkatnya *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) sebagai respon terhadap menurunnya kadar oksigen. Pada keadaan normal HIF didegradasi oleh sistem ubiquitin proteasom. HIF 1 merupakan molekul protein heterodimer, terdiri dari subunit  $\alpha$  dengan BM 120 kDa yang sensitif terhadap perubahan kadar oksigen dan

subunit- $\beta$  dengan BM 91-94 kDa yang merupakan protein konsitutif. HIF 1- $\alpha$  merupakan protein yang labil dan mengalami stabilisasi sebagai respon terhadap hipoksia (Giaccia, 2004). HIF 1- $\beta$  dikenal juga sebagai ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Agar aktif, HIF 1- $\alpha$  harus membentuk kompleks dengan HIF 1- $\beta$  dan keadaan ini dapat terpenuhi jika terjadi hipoksia. Terjadinya hipoksia menyebabkan HIF 1- $\alpha$  menjadi stabil dan selanjutnya membentuk kompleks dengan HIF 1- $\beta$  yang kemudian bertranslokasi ke inti untuk berikatan dengan *hypoxia response element* (HRE) pada promotor gen sasaran HIF-1 dan menginisiasi ekspresi gen (Schuler *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2004, Wenger, 2002). Sejumlah gen akan mengalami peningkatan regulasi yang bertujuan untuk mengurangi ketergantungan sel terhadap oksigen dan meningkatkan pasokan oksigen ke jaringan (Zagorska *et al.*, 2004). Banyak gen yang diregulasi oleh HIF-1 terlibat dalam mekanisme adaptasi terhadap hipoksia, seperti enzim jalur glikolisis, eritropoetin dan VEGF.

Selain menyebabkan meningkatnya HIF, hipoksia juga menyebabkan peningkatan pembentukan dan pelepasan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dari dalam mitokondria yang kemudian akan meregulasi respons terhadap  $O_2$  yang rendah. Pembentukan ROS terjadi terutama pada kompleks III dari rantai transport elektron di dalam mitokondria. Pada pembentukan ubiquinol dari ubiquinon terbentuk radikal ubisemikinon. Radikal ini berpotensi untuk mendonorkan elektronnya kepada  $O_2$  sehingga terbentuk radikal anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ). Pada keadaan hipoksia, pembentukan ROS dari kompleks ini meningkat. Bila transport elektron dihambat dengan inhibitor pada tempat yang lebih proksimal, dengan rotenon, ubiquinon teroksidasi penuh dan pembentukan ROS pada kompleks III tidak terjadi. Peningkatan ROS ini akan memicu jalur transduksi sinyal yang antara lain akan menyebabkan stabilnya HIF 1- $\alpha$  (Giaccia *et al.*, 2004) yang selanjutnya menyebabkan diekspresikannya berbagai protein sebagai respons terhadap hipoksia.

Selama hipoksia, proses pembentukan ROS akan meningkat dan hal ini akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Bila kadar ROS melewati pertahanan antioksidan tubuh, ROS dapat bereaksi dengan lipid, protein dan DNA sehingga menyebabkan kerusakan sel (Giaccia *et al.*, 2004, Giordano, 2005). Peroksidasi lipid merupakan reaksi antara radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh jamak yang banyak terdapat di membran. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan membran organel.

Peroksida lipid akan mengalami degradasi antara lain menjadi malondialdehid (MDA) (Halliwell *et al.*, 1998, Wills, 1987). Ada mekanisme yang melawan-imbang produksi ROS. Glutathion (GSH) merupakan antioksidan utama yang berperan penting dalam mempertahankan kesetimbangan redoks intrasel. Glutathion dapat menangkal sifat merusak ROS

melalui reaksi yang dikatalisis glutathion peroksidase (Haddad, 2002).

## 2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen *in vivo* model hipoksia menggunakan tikus *Sprague-Dwaley*. Hipoksia dilakukan di dalam *hypoxic chamber* yang dialirkan udara dengan konsentrasi 10% oksigen dan 90% nitrogen. Ada 5 kelompok perlakuan yakni kelompok kontrol, hipoksia 1 hari, 3 hari, 7 hari dan 14 hari. Setelah perlakuan, tikus dikorbankan dan diambil organ hatinya.

Jaringan hati ditimbang dan dibuat homogenate dengan larutan PBS pH 7,4 0,1M. Perhitungan kadar protein ginjal dilakukan dengan spektrofotometer pada  $\lambda 280$  nm berdasarkan kurva standar protein yang diperoleh dari BSA. Pengukuran kadar MDA dilakukan menurut metode Wills sedangkan pengukuran kadar GSH dilakukan menurut metode Ellman.

Pengukuran ekspresi gen dilakukan dengan metode *Western Blot*. Protein diisolasi dari jaringan menurut protokol dari kit TriPure<sup>®</sup>. Elektroforesis dilakukan menurut metode Laemmli menggunakan SDS dan poliakrikamid. Blotting dilakukan dengan alat *semi-dry*. Sebagai antibodi primer digunakan anti HIF 1- $\alpha$  dan antibodi sekunder menggunakan anti IgG tikus. Pewarna menggunakan *aminoethyl carbazole* dengan peroksidase.

## 3. Hasil dan Pembahasan

Hipoksia dapat menyebabkan meningkatnya pembentukan ROS di dalam sel. Pembentukan ROS selama sel mengalami hipoksia terutama berasal dari mitokondria tepatnya dari rantai transport elektron (Halliwell, 1998).

ROS yang meningkat pembentukannya di dalam sel akan dilawan imbang oleh senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan. Hal ini bertujuan agar sel tidak mengalami stres oksidatif. Tetapi pada tahap tertentu sel tidak mampu lagi untuk melawan imbang pembentukan ROS di dalam sel.

- Giordano, F.J.. 2005. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia and Heart Failure. *J. Clin. Invest.* 115: 500-8
- Haddad, J.J.. 2002. Oxygen-sensing Mechanisms and The Regulation of Redox-responsive Transcription Factors in Development and Pathophysiology. *Respir Res.* 3: 26-53
- Halliwell, B., *et al.*. 1998. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press. London
- Hanafiah, K.A.. 2005. *Rancangan Percobaan: Teori & Aplikasi*. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta
- Hermes-Lima, M.. 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radical. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John-Wiley & Sons. New Jersey
- Lee, J.W., *et al.*. 2004. Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ): Its Protein Stability and Biological Functions. *Exp. Mol. Med.* Vol. 36:1; 1-12
- Mayes, P.A.. 2003. Glicolysis and Piruvat Oxidation In: Murray, R.K., Granner, D.K.M., Rodwell, V.W., editors. *Harper's Biochemistry*, 26<sup>th</sup> ed. McGraw-Hills. New York
- Nikinmaa, M., *et al.*. 2004. Redox State Regulates HIF 1- $\alpha$  and Its DNA Binding and Phosphorylation in Salmonid Cells. *Journal of Cell Science.* 117(15): 3201-6
- Qun, C., *et al.*. 2003. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(38): 36027-31
- Renart, J., *et al.*. 1979. Transfer of Proteins From Gels to Diazobenzyloxymethyl-Paper and Detection With Antisera: A Method For Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(7): 3116-20
- Schild, L., *et al.*. 2003. Nitric Oxida Produced in Rat Liver Mitochondria Causes Oxidative Stress and Impairment of Respiration After Transient Hypoxia. *FASEB J.* 17: 2194-2201
- Schuler, B., *et al.*. 2005. HIF-1 and the Adaptation of Man to High Altitude. *Sportmedizin und Sporttraumatologie.* 53: 2; 82-87
- Schumaker, P.T., Guzy, R.D.. 2006. Oxygen Sensing by Mitochondria at Complex III: The Paradox of Increased ROS during Hypoxia. *Experimental Physiologi.* 91: 807-19
- Storey, K.B., Storey, J.M.. 2004. Oxygen Limitation and Metabolic Rate Depression. In: Storey, K.B., editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John-Wiley & Sons. New Jersey
- Taylor, C.T., Pouyssegur, J.P., 2007. Oxygen, Hypoxia and Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1113: 87-94
- Towbin, H., *et al.*. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9): 4350-4
- Vaupel, P., *et al.*. 2004. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory mechanism, and Cellular Response. *Oncologist.* 9: suppl 5; 4-9
- Wenger, R.. 2002. Cellular Adaptation to Hypoxia: O<sub>2</sub>-Sensing Protein Hydroxylases, Hypoxia-Inducible Transcription Factors, and O<sub>2</sub>-Regulated Gene Expression. *FASEB.* 16: 1151-62
- Wills, E.D.. 1987. Evaluation of Lipid Peroxidation in Lipids & Biological Membranes. In: Snell, K., Mullock, B., editors. *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL. Oxford
- Zagorska, A., *et al.*. 2004. HIF-1: The Knowns and Unknowns of Hypoxia Sensing. *Acta Biochimica Polonica.* 51(3): 563-78