

**POLA mRNA *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 α* (HIF-1 α) DAN
EKSPRESI PROTEIN HIF-1 α GINJAL TIKUS PADA HIPOKSIA
SISTEMIK KRONIK**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M.Biomed)**

**dr. YULIA SUCIATI
0706170772**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BOKIMIA
JAKARTA
MEI 2009**

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Yulia Suciati

NPM : 0706170772

Tanda tangan :

Tanggal : 28 Mei 2009



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:


Nama : dr. Yulia Suciati
NPM : 0706170772
Program studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pola mRNA *Hypoxia Inducible Factor-1 alpha* (HIF-1 α)
dan Ekspresi Protein HIF-1 α Ginjal Tikus Pada Hipoksia Sistemik Kronik

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. dr. Mohamad Sadikin, Dsc ()

Pembimbing II : dr. Ani Retno Prijanti, MS ()

Penguji I : dr. Sri Widia A. Jusman, MS ()

Penguji II : DR. Dr. Parlindungan Siregar, spPD-KGH ()

Penguji III : DR. rer. Nat. Dra. Asmarinah, MS ()

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI:
Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi ()


Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 28 Mei 2009

KATA PENGANTAR

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

1. Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc sebagai pembimbing I tesis yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini dan memberikan bimbingan kepada saya selama menempuh pendidikan di FKUI
2. dr Ani Retno Prijanti, MS sebagai pembimbing II tesis yang telah mengikutsertakan saya dalam proyek penelitian hipoksia ini, dan telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini dan memberikan bimbingan kepada saya selama menempuh pendidikan di FKUI
3. dr. Sri Widia A Jusman, MS sebagai Ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi sebagai Ketua Program Pasca sarjana, para staff pengajar, pegawai di lingkungan Program studi Ilmi Biomedik dan Kekhususan Biokimia FKUI yang telah memberikan bantuan selama pendidikan dan penyelesaian tesis ini
4. Pimpinan Yayasan dan Rektorat Universitas YARSI, Dekanat FK Universitas YARSI, staff pengajar bagian Biokimia FKUY dan seluruh pegawai yang telah memberikan bantuan baik moril dan materil kepada saya
5. Suami, dr. Riza Setiawan dan anak-anak tercinta, atas doa, dukungan, waktu yang tersita dan pengorbanan yang tulus kepada saya hingga terselesaikannya tesis ini

6. Mama, Papa, Ibu, Bapak, dan adik-adik atas doa dan dukungannya, serta
7. Sahabat-sahabat, 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, khususnya ilmu biomedik.

Jakarta, Mei 2009

Penulis



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

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Yulia Suciati
NPM : 0706170772
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

Pola mRNA *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) dan Ekspresi Protein HIF-1 α Ginjal Tikus pada Hipoksia Sistemik Kronik

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 memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 28 Mei 2009
Yang menyatakan

(Yulia Suciati)

ABSTRAK

Nama : Yulia Suciati
Program studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Pola mRNA *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) dan Ekspresi Protein HIF-1 α Ginjal Tikus pada Hipoksia Sistemik Kronik

Keadaan hipoksia dapat membuat sel melakukan adaptasi melalui ekspresi berbagai macam gen. Banyak gen tersebut adalah gen yang diinduksi oleh suatu faktor transkripsi yang disebut HIF-1. HIF-1 α adalah subunit yang diregulasi oleh kadar oksigen untuk aktifitas faktor transkripsi tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana pola mRNA HIF-1 α dan ekspresi protein HIF-1 α pada organ ginjal dari tikus yang mengalami kondisi hipoksia secara sistemik yang terbagi menjadi 5 kelompok berdasarkan lamanya perlakuan (kelompok kontrol, hipoksia 1, 3, 7 dan 14 hari masing-masing 6 ekor tikus) menggunakan *Hypoxic Chamber* dengan kadar O₂ 8% dan Nitrogen 92%. Pola mRNA HIF-1 α dilihat berdasarkan hasil RT-PCR dengan membandingkan rasio kelompok normoksia dan kelompok hipoksia. Ekspresi protein HIF-1 α dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan menggunakan anti HIF-1 α sebagai antibodi primer.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat penurunan ekspresi mRNA HIF-1 α dibandingkan kontrol pada kelompok hipoksia 1 hari dan diikuti peningkatan pada kelompok hipoksia 3 hari dan mulai mengalami penurunan kembali pada kelompok 7 hari. Sementara protein HIF-1 α memperlihatkan terdapatnya peningkatan ekspresi protein HIF-1 α yang mulai mengalami penurunan pada kelompok hipoksia 14 hari. Dapat disimpulkan bahwa regulasi HIF-1 α terjadi pada tahap transkripsi dan tahap pasca translasi.

Kata kunci :
Hipoksia, ekspresi gen HIF-1 α , Ginjal

ABSTRACT

Name : Yulia Suciati
Study Programme : Biomedical Science
Title : Pattern of *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) mRNA and HIF-1 α protein Expression of Renal Rat in Systemic Chronic Hypoxia

Hypoxia could make cell to adapt through gene expression. Many of these gene induced by the transcription factor called HIF-1. HIF-1 α is the subunit which regulated by oxygen level to activated the transcription factor.

The aim of this study is to know the pattern of *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) mRNA and HIF-1 α protein Expression of Renal Rat in Systemic Chronic Hypoxia which divided to 5 groups based on the duration of hypoxia (control, 1, 3, 7, and 14 days of hypoxia with 6 rats each group) using hypoxic chamber with 8% oxygen and 92% Nitrogen. The pattern was measure with RT-PCR which combine the ratio of control group and the hypoxic group. The protein expression measure with Western Blot method using anti HIF-1 α as 1st antibody.

The result shows that HIF-1 α mRNA expression decrease in 1st day of hypoxia, elevated and reach a peak at 3 days of hypoxia and start to decrease since then. While the HIF-1 α protein shows an increase expression until 14 days of hypoxia which start to decrease. It can be concluded that HIF-1 α regulation occurs in transcription level and post translation.

Key Words:
Hypoxia, HIF-1 α gene expression, Renal

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN KARYA ILMIAH.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Rumusan Masalah.....	3
Hipotesis Penelitian.....	3
Tujuan penelitian.....	3
Tujuan umum.....	3
Tujuan Khusus.....	3
Manfaat penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Pendahuluan.....	5
2.2. Hipoksia.....	5
2.3. HIF-1 α , struktur, regulasi dan gen-gen target.....	6
2.4. Regulasi HIF-1.....	8
2.5. Hipoksia pada Ginjal dan pengaruhnya terhadap kerusakan ginjal...12	
2.6. RT- PCR.....	18
2.7. <i>Western Blot</i>	19
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Disain Penelitian.....	21
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.3. Penetapan jumlah sample penelitian.....	21
3.4. Perlakuan Hipoksia.....	22
3.5. Isolasi DNA, RNA dan protein ginjal tikus.....	23
3.6. Elektroforesis.....	24
3.7. <i>Western Blot</i>	26
3.8. qRT-PCR untuk penetapan kadar mRNA HIF-1 α dengan <i>iScript One Step RT-PCR with SYBR Green</i>	27
3.9. Analisis Statistik.....	30

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kadar protein jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.....	32
4.2. Kadar RNA Total.....	36
4.3. Rasio mRNA HIF-1 α jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.....	37
4.4. Hubungan antara mRNA dan protein HIF-1 α dengan pO ₂ ..	40
4.5. Pembahasan Pengaruh Hipoksia Sistemik Kronik pada Ginjal	42

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	50
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	59



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Gen Target HIF-1.....	12
Tabel 2.2. <i>Mechanisms of chronic hypoxia in the kidney</i>	15
Tabel 4.1. Hasil analisis gas darah dan berat hewan coba.....	30
Tabel 4.2. Kadar protein jaringan ginjal tikus pada kelompok kontrol, hipoksia 1 hari, 3 hari, 7 hari, dan 14 hari.....	32
Tabel 4.3. Kadar RNA total.....	36



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Oksigen memegang peranan penting dalam kehidupan terutama pada organisme aerob, yang menggunakan oksigen dan berperan sebagai akseptor elektron terakhir pada rantai pernafasan dalam rangka memperoleh energi maksimal⁽¹⁾. Sel memiliki respon terhadap perubahan ketersediaan oksigen yang berdampak pada banyak aspek homeostasis baik secara fisiologis maupun patologis⁽²⁾. Selama lebih dari satu dekade terakhir, pemahaman mengenai mekanisme adaptasi terhadap hipoksia pada tingkat molekuler telah jauh berkembang. Sebagai respon terhadap hipoksia, terdapat perubahan ekspresi banyak gen yang ternyata diperantarai oleh suatu faktor transkripsi yang dinamakan *Hypoxia Inducible Transcription Factor (HIF)*⁽¹⁻⁴⁾.

HIF diaktivasi secara fisiologis oleh hipoksia⁽¹⁻⁴⁾. Kedua mRNA subunit HIF (α dan β) dan proteinnya selalu diekspresi, namun subunit HIF 1 α secara cepat langsung didegradasi pada kondisi normoksia⁽¹⁻²⁾. Hal ini menyatakan bahwa jumlah HIF 1 α diregulasi oleh proses degradasi. Dalam keadaan normoksia, proses degradasi diperankan oleh *Oxygen Dependent Degradation Domain (ODD)* yang akan dikenali oleh suatu protein supresor tumor, Von Hippel Lindau (pVHL)⁽¹⁻⁵⁾. Interaksi antara HIF 1 α dan pVHL dipicu oleh adanya hidroksilasi pasca translasi pada residu prolin yang terdapat di ODD HIF 1 α yang dikatalisis oleh HIF-Prolyl Hidroksilase⁽²⁻³⁾. Protein yang terhidroksilasi ini dikenali oleh pVHL, yang berfungsi sebagai komponen kompleks multisubunit ubiquitin ligase. Hal ini mempromosi protein HIF 1 α untuk didegradasi oleh proteasom.⁽¹⁻²⁾ pVHL akan gagal mengenali HIF 1 α dalam kondisi hipoksia, yang akan menyebabkan peningkatan protein HIF 1 α .⁽¹⁾ HIF 1 α akan bertranslokasi ke inti dan berdimerisasi dengan subunit HIF 1 β membentuk faktor transkripsi yang akan berikatan dengan *Hypoxia Response Elements (HREs)* pada promoter dan mengaktivasi lebih dari 60 gen target^(1-3,5).

HIF ternyata juga mempunyai peran penting dalam regulasi proses biologis baik pada kondisi fisiologis maupun patologis ginjal. Ginjal adalah

organ yang sangat sensitif terhadap perubahan pasokan oksigen. Sensitivitas ini memiliki keuntungan salah satunya dengan cara memfasilitasi ginjal untuk memproduksi eritropoetin dalam mekanisme adaptasinya. Regulasi produksi eritropoetin diinduksi oleh HIF 1 α . Namun, tingginya sensitivitas terhadap tekanan oksigen ini juga dapat mengakibatkan kecenderungan ginjal terhadap terjadinya kerusakan sel yang disebabkan hipoksia (*hypoxic injury*).

Ginjal adalah organ yang menunjukkan karakteristik yang unik antara pasokan darah dan oksigenasinya.. Meskipun aliran darah ginjal dan pasokan oksigen tinggi, namun tekanan oksigen di ginjal relatif rendah terutama pada medulla ginjal. Hal ini disebabkan adanya struktur susunan antara arteriol *afferent* dan *efferent* yang paralel, yang memungkinkan oksigen dapat melewati arteriol menuju venula post glomerulus secara difusi. Adanya *countercurrent* yang tertutup pada peritubular ini yang mempertahankan kondisi hipoksia secara fisiologis (10-15 mmHg) ⁽²⁾. Sel –sel segmen tubulus proksimalis dan tubulus distal asendens sangatlah peka terhadap ketiadaan oksigen. Terbatasnya pasok oksigen pada jaringan ginjal menyebabkan ginjal peka terhadap hipoksia dan telah lama diketahui pula bahwa hipoksia memegang peran penting dalam patogenesis dan progresivitas gagal ginjal akut dan kronis. Pada kedua kondisi ini, hipoksia tidak hanya menyebabkan penurunan energi dan aktivasi metabolisme alternatif, namun juga menginduksi mekanisme regulasi melalui ekspresi gen tertentu.

Secara khusus, HIF berperan dalam regulasi angiogenesis, metabolisme energi, apoptosis dan metabolisme besi, regulasi pH dan regulasi vasomotor. Hipoksia memegang peranan penting dalam perkembangan kerusakan ginjal akut, nefropati radiokontras, dan glomerulonefritis akut. Banyak data menunjukkan hipoksia kronik adalah jalur utama dari stadium akhir gagal ginjal kronik ⁽⁸⁾.

Melihat bahwa hipoksia pada ginjal mempunyai peran penting dalam perkembangan dan progresivitas baik gagal ginjal akut maupun kronis, maka aktivasi HIF dapat menjadi sasaran utama terapi dalam pendekatan terapi di masa depan yang dapat dipertimbangkan untuk gagal ginjal, dimana aktivasi

HIF dapat menimbulkan ekspresi berbagai macam gen yang bertujuan untuk mekanisme adaptasi terhadap kondisi hipoksia pada ginjal^(2,8).

1.2 Rumusan Masalah

Dalam keadaan normoksia, subunit HIF 1 α tetap diekspresikan oleh sel, namun langsung mengalami degradasi oleh sistem ubiquitin proteasom proteolisis. HIF 1 α akan teraktivasi bila berikatan dengan HIF 1 β membentuk dimer sebagai faktor transkripsi dalam keadaan hipoksia. Hal ini dimungkinkan karena protein HIF 1 α tidak mengalami degradasi oleh sistem ubiquitin proteasom proteolisis. Berdasarkan itu, dapat disimpulkan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

- 1.2.1 Bagaimanakah pola mRNA HIF 1 α dan ekspresi protein HIF 1 α pada tikus dengan berbagai durasi hipoksia sistemik?
- 1.2.2 Apakah polanya menggambarkan hubungan sebanding antara peningkatan mRNA dan protein HIF 1 α dengan lamanya hipoksia sistemik?

1.3. Hipotesis Penelitian

- 1.3.1 Hipoksia sistemik kronis meningkatkan ekspresi mRNA HIF-1 α pada ginjal.
- 1.3.2. Hipoksia sistemik yang kronis meningkatkan ekspresi protein HIF 1 α pada ginjal.
- 1.3.3. Terdapat hubungan antara ekspresi mRNA HIF-1 α dan protein HIF-1 α .

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum :

Mempelajari respon ginjal pada tingkat molekul dalam keadaan hipoksia sistemik kronis

1.4.1.2. Tujuan Khusus

1. Mempelajari perubahan ekspresi HIF 1 α pada tingkat mRNA
2. Mempelajari perubahan tranlasi HIF 1 α pada tingkat protein

1.5 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan akan menambah pemahaman pada keadaan hipoksia yang dialami ginjal pada tingkat molekuler dan dari sini diharapkan dapat memberi sumbangan untuk mengarahkan pengembangan obat dan pemberian tindakan.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PENGANTAR

Oksigen memegang peran utama dalam keberlangsungan kehidupan, terutama pada organisme aerob yang menggunakan oksigen yang berperan sebagai akseptor elektron terakhir pada rantai pernafasan dalam rangka memperoleh energi maksimal. Oleh karena itu kemampuan untuk mempertahankan homeostasis oksigen sangat penting bagi organisme, baik vertebrata maupun invertebrata. Untuk ini, sistem fisiologi berkembang untuk memastikan oksigenasi yang optimal bagi tiap sel suatu organisme. Pada invertebrata sederhana, difusi langsung O_2 sudah cukup untuk oksigenasi, namun pada manusia dan vertebrata lainnya, luasnya permukaan tubuh telah dihubungkan dengan perkembangan infrastruktur fisiologis yang lebih kompleks untuk penghantaran O_2 , yang terdiri atas *intake and pumping station* (paru dan diafragma), transporter (eritrosit), alat *propulsion device* (jantung), dan sistem vaskularisasinya.¹

Organisme aerob memiliki kemampuan untuk mengindera dan memberikan respon terhadap perubahan kadar oksigen guna kelangsungan hidupnya. Mekanisme penginderaan oksigen (*oxigen sensing*) ini dikembangkan untuk menjaga homeostasis oksigen, sekaligus untuk beradaptasi terhadap kondisi hipoksia (suplai oksigen kurang dari yang dibutuhkan jaringan). Penginderaan oksigen ini dilakukan oleh sel-sel kemoreseptor seperti badan karotis dan neuroepitelial yang akan meregulasi sistem kardiovaskular dan frekuensi pernafasan. Namun saat ini diyakini tiap sel yang memiliki inti dapat juga merespon kekurangan O_2 (hipoksia) baik akut maupun kronik yang berakibat akan terjadinya adaptasi baik pada kondisi akut berupa kompensasi maupun keadaan kronik berupa perubahan-perubahan ekspresi gen.⁹

2.2 HIPOKSIA

Hipoksia adalah suatu istilah yang menggambarkan keadaan sel dengan kadar oksigen berada di bawah kadar normal jaringan tersebut. Dalam kondisi normoksia, udara yang kita hirup mengandung kurang lebih 21% O_2 . Rentang

variasi yang cukup besar ditemukan pada organ atau jaringan yang berbeda. Kadar oksigen seluler antara 0,02%- 3% dapat dikatakan hipoksia, dan bila kadar oksigen berada dibawah 0,02% dikatakan anoksia. Namun ada pula yang mengatakan hipoksia adalah kondisi yang terjadi bila oksigenasi jaringan berkurang menjadi dibawah tekanan oksigen kritis. Tekanan oksigen kritis adalah tekanan minimal oksigen yang diperlukan untuk oksidasi sitokrom c dalam mitokondria secara sempurna. Nilai ini berbeda-beda pada tiap jenis sel. Sebagai contohnya, tekanan oksigen kritis untuk tubulus proksimal ginjal adalah 10-17 mmHg. Namun definisi praktis dari hipoksia adalah apabila suplai oksigen kurang dari yang dibutuhkan oleh organ, jaringan, atau sel sehingga mempengaruhi fungsi biologis. Terdapat berbagai istilah yang memiliki arti berbeda namun seringkali tertukar mengenai hal ini. Iskemia merupakan kondisi hipoksia yang disebabkan oleh bendungan atau terhambatnya sirkulasi vaskuler suatu jaringan, sedangkan anoksia menunjukkan ketidakterediaan oksigen yang seharusnya dibuktikan dengan tidak berfungsinya sitokrom oksidase di mitokondria. Anoksia kimia terjadi jika terdapat inhibitor metabolik yang menginduksi pengurangan jumlah ATP atau penurunan kadar oksigen.¹⁰

Hipoksia dapat disebabkan oleh rendahnya tekanan parsial O₂ pada arteri akibat penyakit paru atau pada dataran tinggi (hipoksia hipoksemik). Dapat pula disebabkan oleh berkurangnya kemampuan darah dalam mengangkut O₂ akibat anemia, methemoglobinemia, dan keracunan karbon monoksida, berkurangnya perfusi jaringan baik umum maupun lokal (hipoksia iskemik), gangguan difusi, dan ketidakmampuan sel dalam menggunakan O₂ akibat intoksikasi contoh pada keracunan sianida (hipoksia histotoksik).

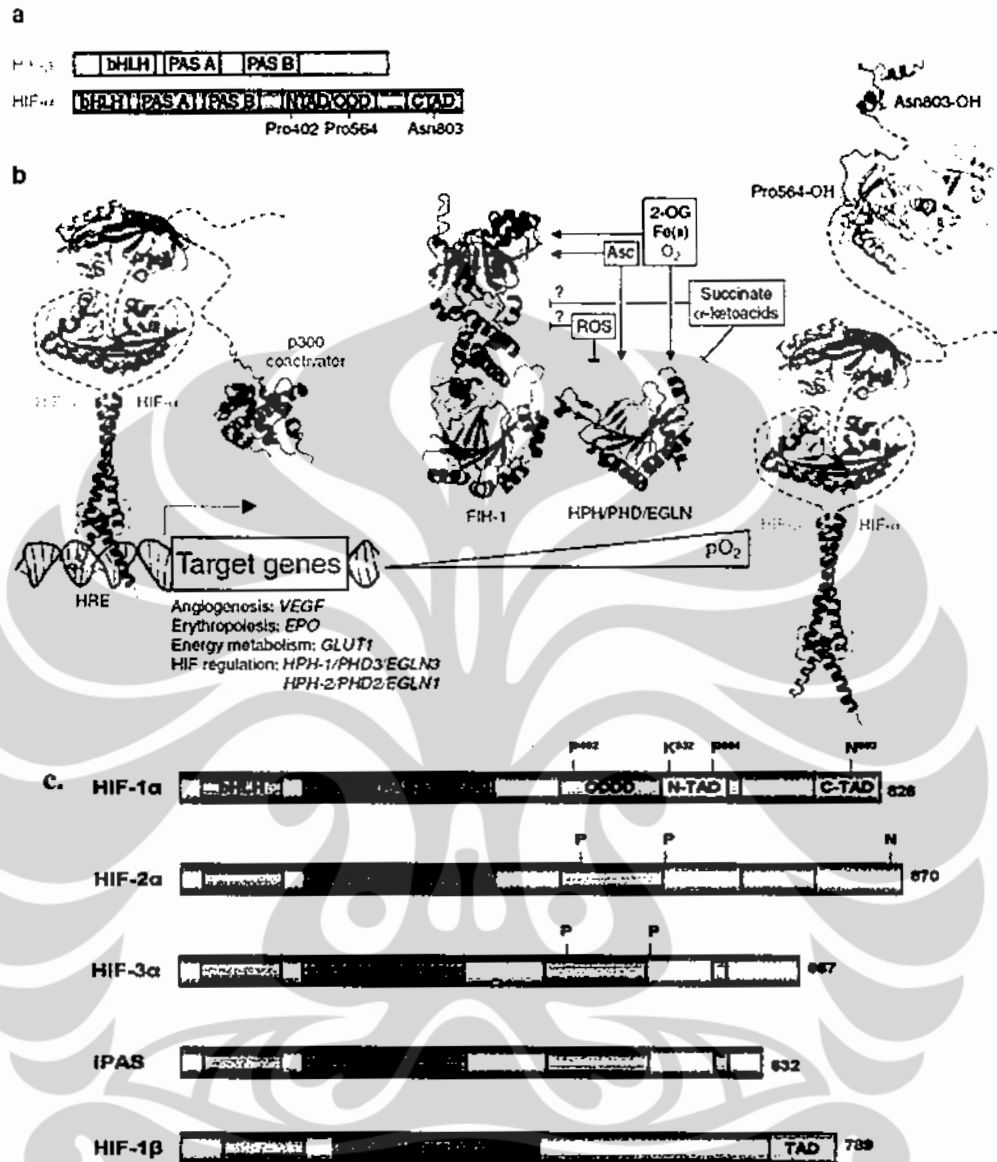
2.3 HIF 1 α , struktur, regulasi dan gen-gen target

Pada sel mamalia, paparan akan adanya lingkungan rendah oksigen akan merangsang jalur respon hipoksia yang berpusat pada regulasi ekspresi suatu faktor transkripsi. HIF 1 α adalah suatu faktor transkripsi yang ditemukan ketika teridentifikasinya HRE (*Hypoxia Response Element*) pada *enhancer 3'* gen eritropoetin (EPO), suatu hormon yang menstimulasi proliferasi eritrosit. Berdasarkan penelitian ditemukan bahwa protein yang menempel pada HRE

tersebut adalah HIF 1, suatu protein heterodimer yang terdiri atas subunit α dan β , dan subunit β selalu terekspresi. HIF 1 β dikenal juga sebagai ARNT (*Aryl hydrocarbon Translocator*). Sejak ditemukannya hingga saat ini diketahui ternyata HIF 1 bekerja pada promotor bermacam-macam gen yang terinduksi oleh kondisi hipoksia ini.^{1,2,4,11-19}

Berdasarkan strukturnya, HIF 1 adalah suatu heterodimer yang terdiri atas HIF 1 α dan β . Sisi amino kedua subunit mengandung domain *basic-helix-loop-helix* (bHLH) dan PER-ARNT-SIM (PAS). Tiap subunit mengandung dua domain PAS, yaitu PAS- A dan PAS- B. Domain PAS ini mengandung 100-120 asam amino, terlipat dalam lima untai antiparalel lembaran- β dan diapit oleh beberapa heliks α . Domain bHLH adalah suatu superfamili yang luas dari dimer faktor transkripsi eukariot, dengan domain HLH memediasi dimerisasi, sementara *basic domain* yang akan berikatan dengan HRE-DNA (Gambar 2.1.b).² Terdapat dua domain transaktivasi, yaitu N- terminal (N-TAD) dan C-terminal (C-TAD). Pada domain C-TAD dapat berikatan ko-aktivator seperti CBP/p300 untuk mengaktifkan transkripsi gen (Gambar 2. 1.a dan 2. 1. c).^{1,2,4,11-19}

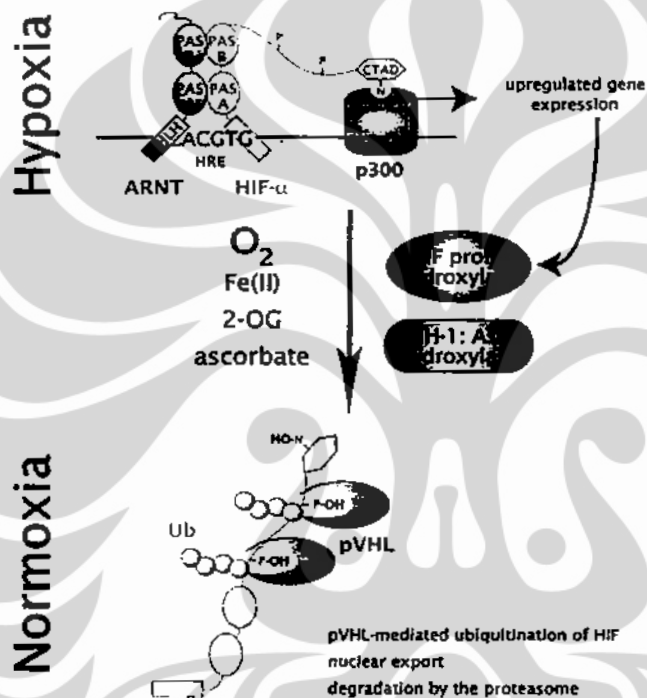
Pada mamalia, terdapat tiga gen yang menyandikan subunit HIF α yang memiliki regulasi yang hampir sama, yaitu HIF 1 α , HIF 2 α , HIF 3 α . HIF 2 α memiliki 48% sekuens asam amino yang serupa dengan HIF 1 α .. Berbeda dengan ekspresi HIF 1 α , ekspresi HIF 2 α terutama pada paru, endotel, dan badan karotis.³ Sementara HIF 3 α , yang ditemukan terakhir, juga diekspresikan pada berbagai jaringan namun lebih terbatas dalam regulasi homeostasis oksigen.⁹

Gambar 2.1. Struktur HIF 1¹¹

2.4 Regulasi HIF 1^{1,2,4,11-19}

Aktivitas biologis HIF 1 ditentukan dari ekspresi dan aktivitas subunit HIF 1α. Regulasi ekspresi dan aktivitasnya dapat terjadi pada beberapa tahap, yaitu ekspresi mRNA, ekspresi protein, lokalisasi inti sel dan translokasi. Di antara ini semua, yang paling banyak dipelajari adalah regulasi pada tahap ekspresi tingkat protein.

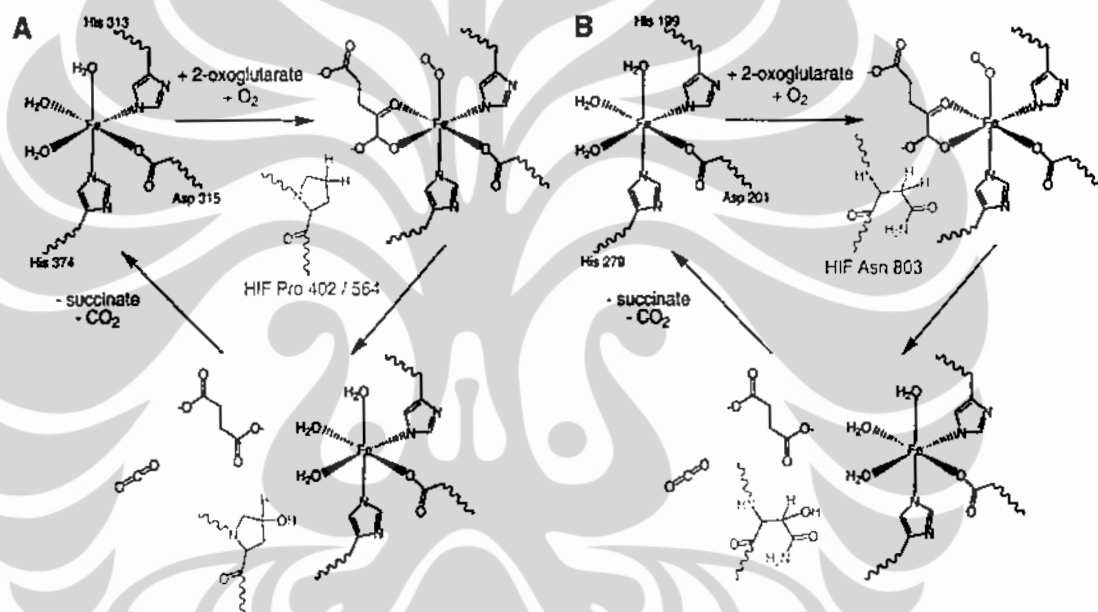
Baik HIF 1 α maupun HIF1 β , adalah protein yang secara terus menerus terekspresi, namun terdapat perbedaan sensitivitas pada perubahan ketersediaan oksigen. HIF1 β tidak sensitif terhadap adanya perubahan ini. Protein HIF 1 α memiliki waktu paruh yang pendek (t 1/2~5 menit) dan sangat diatur oleh oksigen.¹⁰ Meskipun demikian, transkripsi dan sintesis HIF 1 α berlangsung terus menerus tidak terpengaruh akan ketersediaan oksigen. Hanya saja pada kondisi normoksia, protein HIF 1 α akan segera terdegradasi sehingga akan sulit mencari keberadaannya.



Gambar 2.2.
Regulasi HIF pada kondisi normoksia dan hipoksia¹

Modifikasi HIF 1 α terjadi pada beberapa bagian domain. Dalam keadaan suplai oksigen yang adekuat, hidroksilasi dua residu prolin dan asetilasi residu lisin pada domain ODD akan menyebabkan interaksi antara HIF 1 α dengan von Hippel-Lindau protein tumor supresor (pVHL), yang merupakan bagian dari E3-Ubiquitin Ligase kompleks yang akan membawa HIF 1 α untuk didegradasi melalui jalur proteasom (Gambar 2.2). Interaksi antara pVHL/ HIF 1 α sangat lestari antara spesies dan membutuhkan hidroksilasi dari residu prolin yang spesifik (Pro402 dan Pro564 pada HIF 1 α manusia) pada domain *Oxygen-Dependent Degradation Domain* (ODD) HIF 1 α . Hidroksilasi Prolil oleh proliil 4 hidroksilase (PHD) dan pengikatan ke pVHL sangat diperlukan untuk eksekusi

proteolisis HIF 1 α pada kondisi normoksia. Enzim PHD ini merupakan dioksigenase yang menggunakan besi, oksigen dan 2-oksoglutarat sebagai substratnya. Adanya oksigen akan menyebabkan PHD aktif dan dapat menghidroksilasi prolin, sehingga hasil akhirnya dapat terjadi degradasi HIF 1 α , sementara ketiadaan oksigen akan menyebabkan hilangnya aktivitas enzimatis, sehingga hidroksilasi prolin tidak terjadi. Dengan demikian tidak akan ada interaksi pVHL dan HIF 1 α , dan akan berakibat stabilisasi dan akumulasi HIF 1 α di dalam sel. HIF-1 α yang terstabilisasi akan berdimer dengan HIF-1 β untuk mengaktifkan gen sasaran. Kebutuhan mutlak akan adanya oksigen sebagai ko substrat memungkinkan PHD sebagai sensor oksigen pada sel (Gambar 2.3).¹⁰⁻¹²



Gambar 2.3 . Modifikasi polipeptida HIF oleh Prolin dan asparagil hidroksilase HIF.¹

Dalam kondisi hipoksia, terdapat beberapa pengaturan, di antaranya adalah stabilisasi melalui modifikasi pasca translasi melalui PHD yang tidak aktif, yang menyebabkan tidak terjadinya hidroksilasi prolin sehingga pVHL tidak mengenali HIF 1 α untuk didegradasi. Terdapat tiga PHD yang telah teridentifikasi pada mamalia, yaitu PHD1, PHD2, PHD3. Namun stabilisasi saja tidak cukup untuk aktivasi transkripsi. Pengaturan kedua adalah modulasi dari transaktivasi domain N-TAD (*N-Trans Activation Domain*) dan C-TAD (*C-Trans Activation Domain*).

Domain ini berfungsi untuk mengikat koaktifator transkripsi seperti CBP/p300, SRC-1, TIF2. Dalam keadaan normal, hidroksilasi residu asparagin pada domain C-TAD (Asn803) oleh FIH (*Factor Inhibiting HIF*) akan mencegah interaksi HIF 1 α dengan CBP/p300. Namun hipoksia membatalkan hidroksilasi asparagin, sehingga C-TAD HIF 1 α dapat berinteraksi dengan CBP/p300 yang berakibat aktivasi transkripsi gen target yang dituju.¹⁰⁻¹²

Sel dan organ perlu untuk beradaptasi pada perubahan suplai oksigen, maka tidaklah mengherankan manakala diketahui terdapat bermacam-macam gen sasaran HIF 1 yang meregulasi kondisi ini. Hingga saat ini telah diketahui terdapat lebih dari 100 gen yang diregulasi oleh HIF 1 dengan berbagai macam fungsi (Tabel 2.1).¹¹

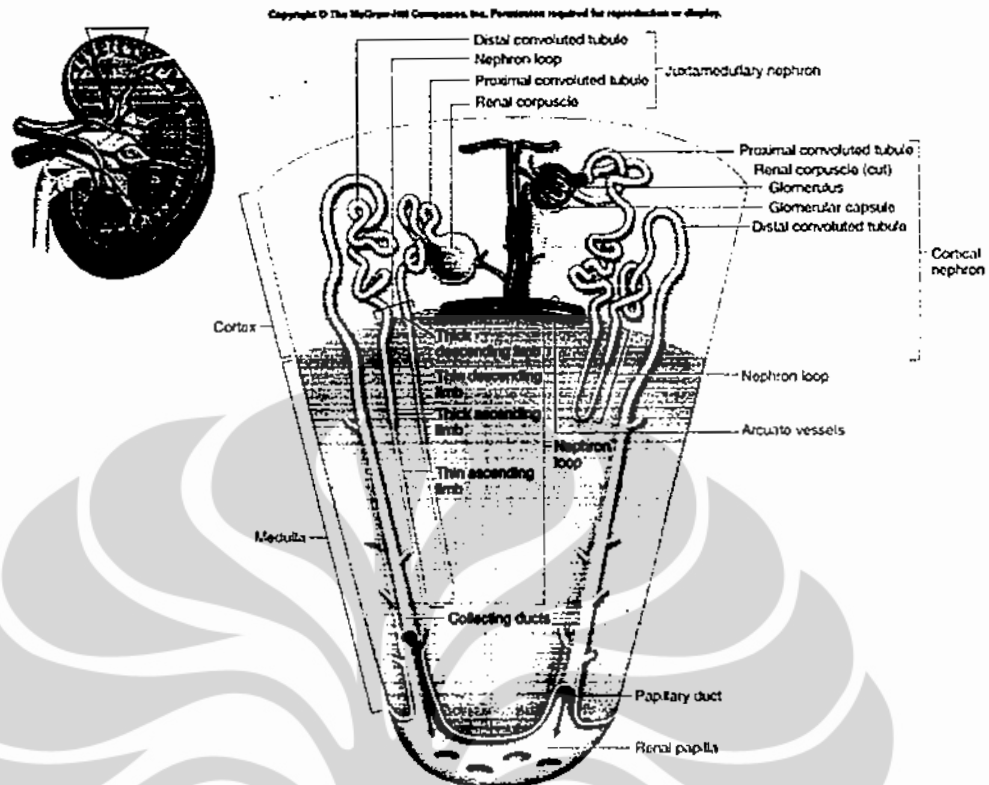
Untuk dapat mengaktifkan transkripsi gen sasaran ini, HIF 1 α akan dimerisasi dengan HIF 1 β , dan heterodimer ini akan berikatan dengan DNA pada sekuens konsensus 5'-RCGTG-3'. Situs ikatan HIF-1 α terdapat pada *Hypoxia Response Element (HRE)*, suatu cis-acting sekuens regulator transkripsi yang dapat berada pada sisi 5' atau 3' atau diantaranya pada gen target.⁹

TABEL 2.1	
Gen Sasaran HIF-1	
Fungsi	Gen
Eritropoiesis/ metabolisme besi	Erythropoietin (EPO)
	Transferrin (Tf)
	Transferrin receptor (Tfr)
Angiogenesis	Ceruloplasmin
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)
	Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF)
	Leptin (LEP)
Vascular tone	Transforming growth factor- β (TGF- β)
	Nitric oxide synthase (NOS2)
	Heme oxygenase 1
	Endothelin 1 (ET1)
	Adrenomedullin (ADM)
Matrix metabolism	β 1B-Adrenergic receptor
	Matrix metalloproteinases (MMPs)
	Plasminogen activator receptors and inhibitors (PAIs)
Metabolisme Glukosa	Collagen prolyl hydroxylase
	Adenylate kinase-3
	Aldolase-A, C (ALDA, C)
	Carbonic anhydrase-9
	Enolase-1 (ENO1)
	Glucose transporter-1,3 (GLUT1,3)
	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)
	Hexokinase 1,2 (HK1,2)
	Lactate dehydrogenase-A (LDHA)
	Pyruvate kinase M (PKM)
	Phosphofruktokinase L (PFKL)
	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)
	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate-3 (PFKFB3)
	Cell proliferation/survival
Transforming growth factor- β (TGF- β)	
Adrenomedullin (ADM)	
Apoptosis	Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3)
	Nip3-like protein X (NLX)

Sumber: Ke, Q et al, 2006, Mol Pharmacol 70:1469-80¹¹

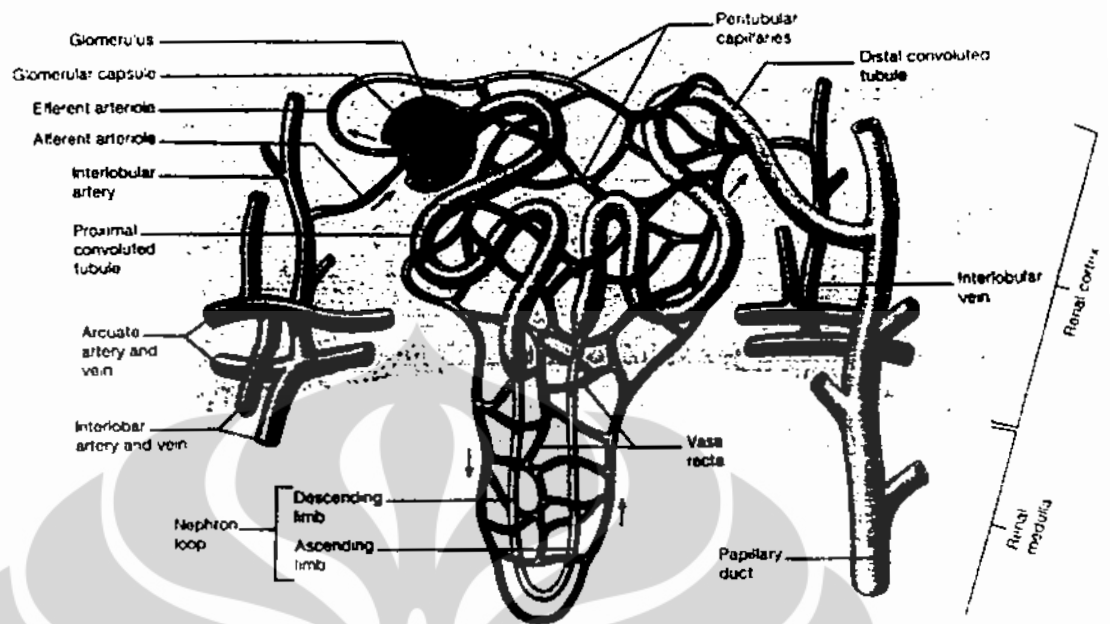
2.5 Hipoksia pada ginjal dan pengaruhnya terhadap kerusakan ginjal

Dalam rangka mempertahankan kondisi milieu darah yang stabil, maka fungsi ginjal dibutuhkan dalam mempertahankan tingginya filtrasi glomerulus, bahkan dikatakan seluruh plasma akan mengalami filtrasi tiap 30 menit.¹³ Namun dari yang difiltrasi, hanya 1% yang dieksresi, 99% akan kembali di reabsorpsi. Proses ini memerlukan transport aktif dan menggunakan oksigen. Hal ini berakibat bahwa ginjal adalah organ kedua yang banyak menggunakan oksigen setelah jantung (Gambar 2.4).



Gambar 2.4. Struktur nefron ginjal, Sumber: [www. Imagegoogle.com](http://www.imagegoogle.com)

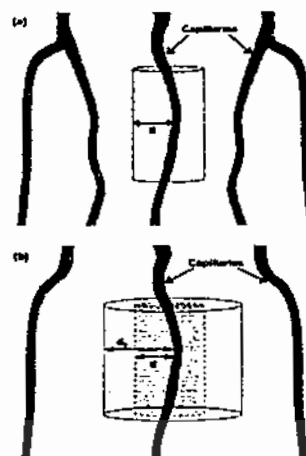
Ginjal adalah organ yang unik dalam hal tekanan oksigen jaringan. Walaupun aliran darah ke ginjal relatif tinggi dibandingkan organ-organ tubuh lainnya ($\pm 20\%$ dari curah jantung), namun tekanan oksigen jaringan ginjal relatif lebih rendah dan bervariasi dibanding dengan organ lainnya. Sebagai contoh tekanan oksigen pada medulla ginjal tidak pernah lebih dari 10 mmHg, dan tekanan rata-rata pada korteksnya ± 30 mmHg. Rendahnya tekanan ini disebabkan oleh berbagai hal, di antaranya adalah struktur anatomi pada arteri preglomerular dan vena yang berjalan parallel yang memungkinkan untuk terjadinya pertukaran oksigen secara difusi sehingga dapat menurunkan pO_2 korteks ginjal. Honig et al mengatakan bahwa jarak 15-30 μm kedua pembuluh darah tersebut dapat terjadi difusi oksigen. Namun penelitian lain mengatakan hal ini tergantung selain pada jarak kedua pembuluh darah juga pada luas permukaan untuk dapat terjadinya pertukaran oksigen (Gambar 2.5 dan 2.6).^{2,12-16}



Gambar 2.5. Vaskularisasi ginjal, Sumber : www.imagegoogle.com

Adanya pirau O_2 pada daerah arteri dan vena preglomerular dapat memberikan keuntungan berupa terbatasnya PO_2 korteks sehingga akan mengurangi produksi *Reactive Oxygen Species*. Namun hal ini juga menyebabkan ginjal sangat rentan terhadap kondisi hipoksia. Berbeda dengan korteks, pada medulla ginjal yang terbagi menjadi dua daerah, medulla dalam dan luar, daerah ini secara fisiologis berada pada kondisi hipoksia, ditandai oleh konsumsi O_2 yang tinggi berbanding terbalik dengan pasok O_2 yang rendah. Aliran darah medulla dikatakan hanya 10% dari aliran darah ginjal. Nefron ginjal bagian medulla ini tampak beradaptasi baik terhadap kondisi hipoksia, sehingga memiliki daya proteksi yang lebih baik dibandingkan korteks dan bagian luarnya pada kondisi hipoksia patologis.¹²

Gambar 2.6. Skema pirau O₂ pada Kapiler yang berdekatan. Sumber: www. Imagegoogle.com



Respon terhadap kondisi hipoksia berbeda pada masing-masing sel ginjal. Terdapat korelasi yang erat antara kegagalan fungsi ginjal dan seberapa besar kerusakan tubulointerstisial ginjal pada beberapa penelitian, yang menunjukkan bahwa ada jalur akhir rusaknya fungsi ginjal disebabkan kerusakan jaringan tubulointerstisialnya. Terdapat data yang menunjukkan bahwa hipoksia kronik pada ginjal dapat menyebabkan kerusakan tubulointerstisial dan berakibat pada gagal ginjal tahap akhir (Tabel 2.2). Terdapat berbagai mekanisme yang dapat menyebabkan hipoksia kronis pada jaringan tubulointerstisial ginjal.^{2,14}

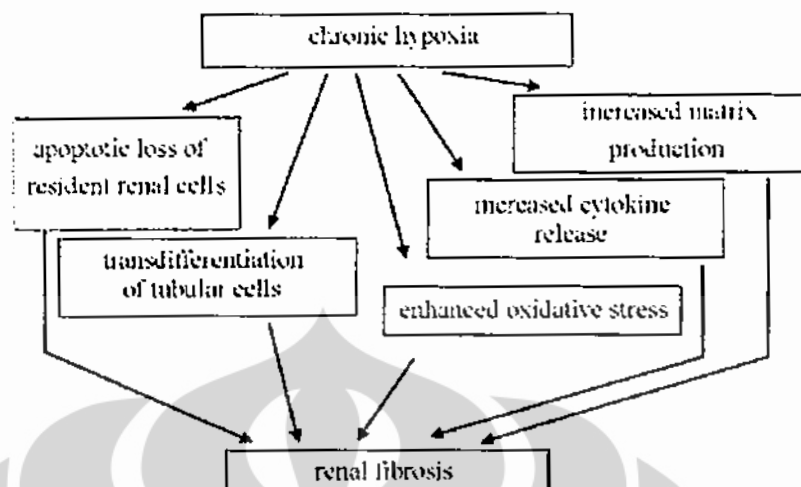
<i>Table 2.2. Mechanisms of chronic hypoxia in the kidney</i>
<i>Structural</i>
<i>(1) Damage to renal arteries and arterioles due to tubulointerstitial injury</i>
<i>(2) Loss of peritubular capillaries due to tubulointerstitial injury</i>
<i>(3) Impairment of oxygen diffusion due to fibrosis</i>
<i>Functional</i>
<i>(1) Stagnation of blood flow due to leukostasis induced by inappropriate Activation of peritubular capillary endothelium</i>
<i>(2) A decrease in peritubular perfusion due to impairment of the "parent" glomerular capillary bed</i>
<i>(3) Imbalances in vasoactive substances and associated intrarenal vasoconstriction (ex. RAS activation)</i>
<i>(4) Inefficient cellular respiration induced by oxidative stress</i>
<i>(5) Relative hypoxia due to increased energy demands (ex hyperfiltration)</i>
<i>(6) Alteration of regulation of renal blood perfusion due to oxidative stress</i>
<i>(7) Impaired oxygen delivery due to renal anemia</i>

Sumber: Nangaku et al, 2008, Chinese Med Journal; 121 (3):257-64¹⁵

Penelitian histologis menunjukkan bahwa sebagian besar kerusakan jaringan tubulointerstisial ginjal berhubungan dengan kerusakan arteri dan arteriol ginjal, kerusakan dan kehilangan kapiler peritubulus, sehingga menyebabkan penurunan perfusi peritubular dan pasok oksigen tubulus. Meskipun kapiler peritubularnya masih utuh, namun fibrosis yang terjadi pada jaringan

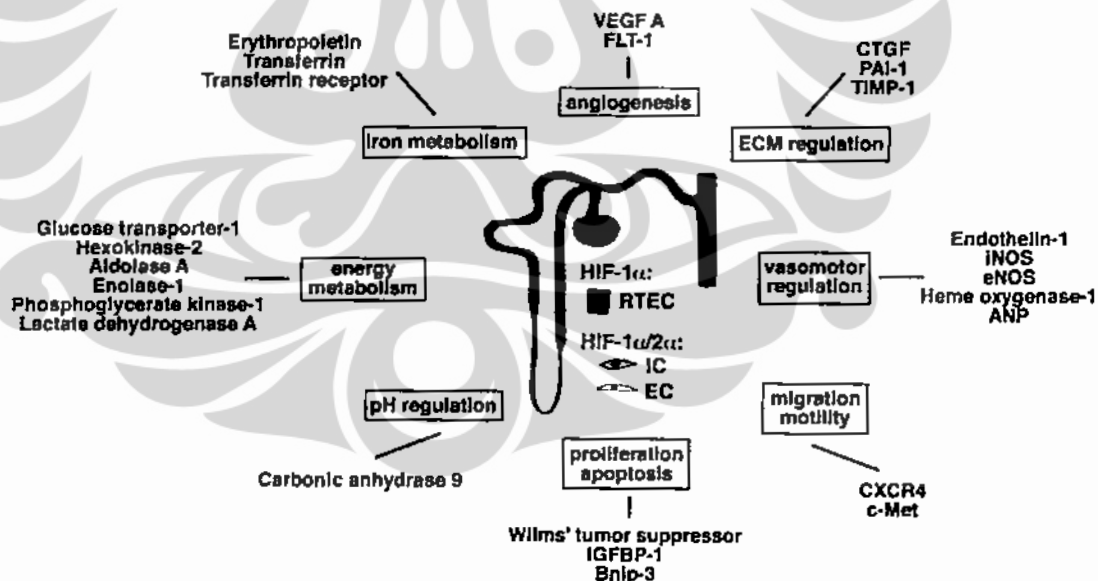
interstisialnya tetap menghambat suplai oksigen bagi tubulus karena menurunkan kemampuan difusi oksigen. Perlu difikirkan bahwa hipoksia dapat merupakan faktor perangsang profibrogenik untuk sel sel tubulus, fibroblast interstitial, dan sel endotel mikrovaskular ginjal. Sel tubulus pada kondisi hipoksia dapat merangsang transdiferensiasi sel epitel mesenkim untuk menjadi miofibroblas. Hipoksia juga merangsang fibroblas dan mengubah metabolisme matriks ekstra sel ginjal. Respon fibrogenik dapat mengarahkan tersumbatnya kapiler peritubular. Hal ini menyebabkan sel tubulus renal menjadi lebih parah kondisi hipoksianya, dapat terjadi defisit energi dan dapat menuju apoptosis. Bila digabungkan antara transdiferensiasi, apoptosis sel-sel tubulus ginjal, aktivasi fibroblas dan tersumbatnya kapiler peritubulus, maka hal ini merupakan kombinasi terhadap progresivitas gagal ginjal pada tahap paling akhir.² Hipoksia juga berperan dalam patogenesis penyakit ginjal sebelum terjadinya kerusakan jaringan tubulointerstitial. Hal ini dimungkinkan karena rusaknya kapiler glomerulus yang menyebabkan rusaknya atau gagalnya perfusi dari arteriol *efferent* serta kapiler peritubulus. Terdapat juga mekanisme lain dalam memperburuk kondisi ini, seperti teraktivasinya RAS (*Renin Angiotensin System*) yang berperan pada terjadinya konstriksi arteriol *efferent*, hipoperfusi kapiler peritubular, dan hipoksia jaringan tubulointerstitial.^{2,14}

Teraktivasinya RAS (*Renin-Angiotensin System*), akan berakibat meningkatnya sintesis angiotensin II. Salah satu jalur utama Angiotensin II dalam menginduksi hipoksia ginjal adalah melalui perubahan struktur sirkulasi ginjal. Angiotensin II merusak vaskularisasi ginjal dan menginduksi fibrosis dengan cara stimulasi sitokin fibrogenik utama, TGF- β (*Transforming Growth Factor*), dan meregulasi reseptor TGF- β . Angiotensin II juga menginduksi NADPH oksidase sehingga berakibat meningkatkan cekaman oksidatif ginjal. Cekaman oksidatif dapat merusak organ melalui berbagai mekanisme yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan ginjal akibat proses inflamasi dan mempercepat proses fibrosis ginjal. Berikut adalah bagan alir mengenai patofisiologi fibrosis ginjal (Gambar 2.7).^{2,14}



Gambar 2.7. Bagan Alir hubungan hipoksia dengan fibrosis ginjal melalui beberapa mekanisme.²

Sehubungan dengan kondisi hipoksia akan menstabilkan HIF, protein ini ternyata juga berperan dalam regulasi proses biologi yang sangat luas berkenaan dengan fungsi ginjal baik dalam kondisi fisiologis maupun patologis. Hal ini termasuk metabolisme glukosa dan energi, angiogenesis, eritropoesis, homeostasis besi, migrasi sel, dan interaksi sel matriks (Gambar 2.8).¹²



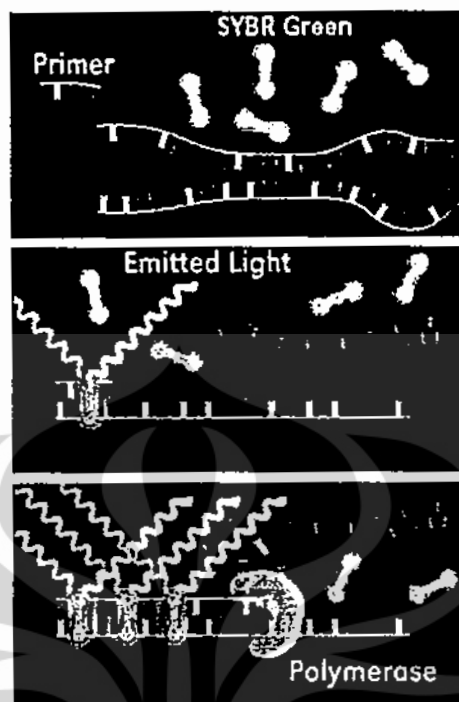
Gambar 2.8 . Beberapa gen target yang transkripsinya dipengaruhi langsung oleh HIF pada fungsi ginjal¹²

2.6. Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)

PCR adalah suatu metode perbanyakan DNA secara enzimatik sehingga DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis/penelitian. Istilah reaksi berantai digunakan karena perpanjangan rantai DNA dilakukan dalam siklus yang berulang-ulang (25-30 siklus).²¹

Pada PCR konvensional, produk amplifikasi atau ampikon, dideteksi melalui analisis pada tahap akhir dengan cara elektroforesis DNA pada gel agarose setelah reaksi selesai. Namun pada *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), untai RNA akan mengalami *reverse transcription* lebih dahulu menjadi *complementary DNA* (cDNA) dengan enzim *reverse transcriptase*, selanjutnya cDNA akan mengalami amplifikasi seperti prinsip PCR konvensional. Sementara Real Time PCR yang juga disingkat RT-PCR atau *quantitative real time polymerase chain reaction* (Q-PCR/qPCR) memiliki prinsip yang sama dengan PCR konvensional, namun pada Real Time PCR, akumulasi ampikon dapat dideteksi dan diukur ketika berjalannya reaksi.²² Seringkali, *real-time polymerase chain reaction* dikombinasikan dengan *reverse transcription* untuk menghitung secara kuantitatif atau semikuantitatif *messenger RNA* (mRNA) pada sel atau jaringan.

Deteksi Real Time dari produk PCR dimungkinkan karena adanya molekul yang berfluoresens yang ikut dalam reaksi. Molekul ini yang melaporkan peningkatan jumlah DNA yang meningkat secara proporsional melalui sinyal fluoresens. Zat kimia yang dapat digunakan untuk tujuan ini dapat berupa *DNA-binding dyes* seperti *SYBR Green I* dan pelacak atau sekuens spesifik primer yang telah dilabel fluoresens. Dibutuhkan *thermal cyclers* khusus yang dapat mendeteksi sinyal fluoresens yang digunakan untuk memonitor sinyal ketika proses amplifikasi berlangsung. Jumlah fluoresensi menggambarkan jumlah produk yang teramplifikasi pada tiap siklus.²²



Gambar 2.9. *SYBR Green I*

SYBR Green I sangat umum digunakan untuk RT-PCR, yang akan berikatan secara non spesifik dengan DNA untai ganda. SYBR Green I akan sedikit memberikan fluoresens saat bebas dalam larutan, namun fluoresensinya akan meningkat hingga 1000 kali lipat bila berikatan dengan DNA. Jumlah sinyal fluoresens dari suatu reaksi sebanding dengan jumlah DNA untai ganda yang ada, dan akan meningkat ketika target teramplifikasi.²²

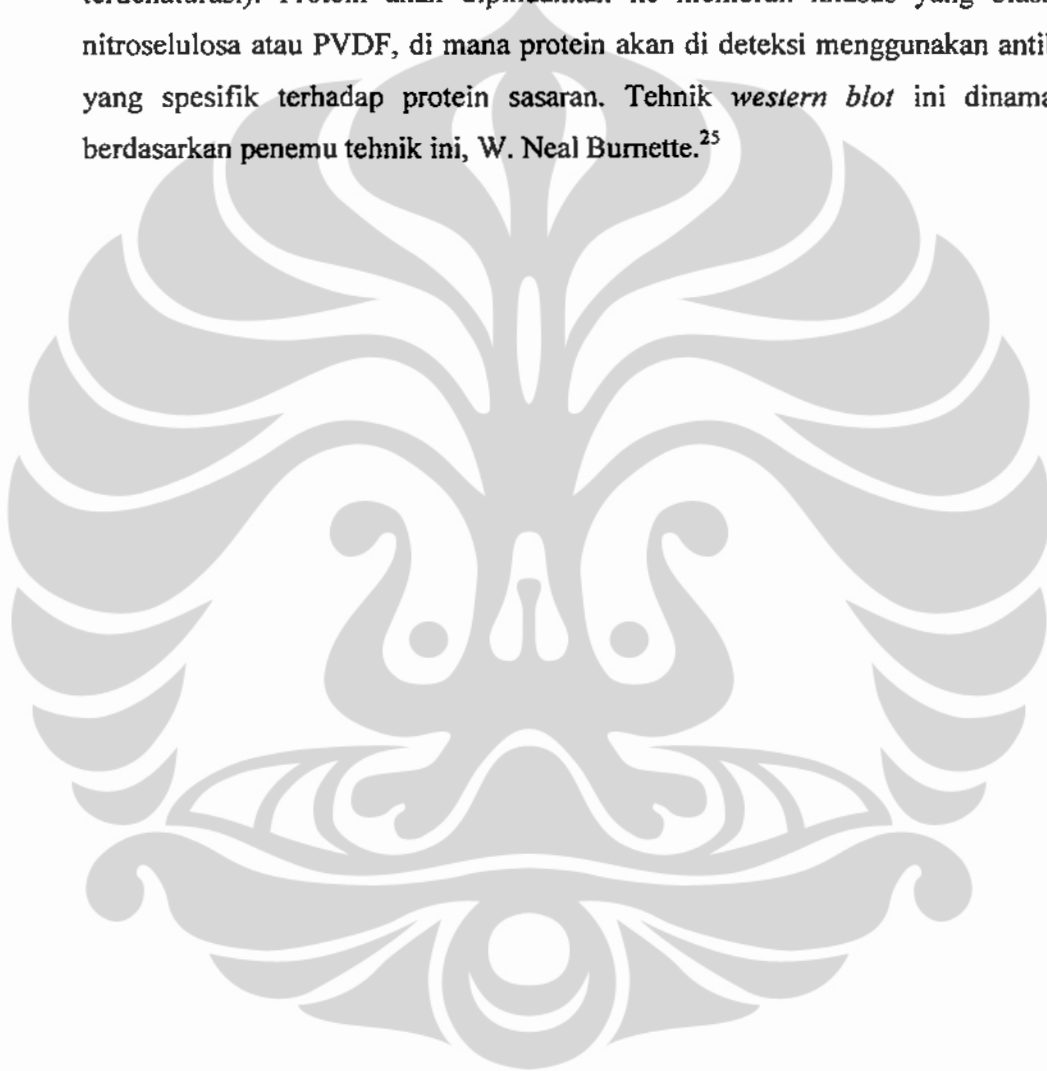
Keuntungan utama dari RT-PCR dibandingkan dengan PCR konvensional adalah dengan RT-PCR memungkinkan kita untuk dapat memutuskan jumlah ulangan cetakan dengan akurasi dan sensitivitas yang tinggi. Data RT-PCR dapat dievaluasi tanpa melakukan elektroforesis gel, yang berdampak terhadap efisiensi waktu penelitian.²²

2.7. *Western Blot*

Blotting pertama kali diperkenalkan oleh Southern pada 1975 yang melakukan pemindahan DNA dari gel agarose ke membran nitroselulosa. Sejak itu, *blotting* mulai dilakukan untuk pemindahan RNA dan protein baik dari gel agarosa maupun dari poliakrilamid. Untuk mengurangi inefisiensi dari transfer

kapiler, maka Towbin et al pada tahun 1979 menggunakan arus listrik untuk memindahkan protein dari gel poliakrilamid.^{23,24}

Western blot atau *immunoblot* adalah metode untuk mendeteksi protein spesifik dari ekstrak jaringan atau homogenatnya. *Western blot* menggunakan gel elektroforesis untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya (bila protein terdenaturasi) atau berdasarkan struktur 3 dimensi (bila protein tidak terdenaturasi). Protein akan dipindahkan ke membran khusus yang biasanya nitroselulosa atau PVDF, di mana protein akan di deteksi menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein sasaran. Teknik *western blot* ini dinamakan berdasarkan penemu tehnik ini, W. Neal Burnette.²⁵



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo*. Penelitian ini menggunakan tikus Spraque Dawley. Jantan yang sehat, umur 10-12 minggu dengan berat badan 150-200 gr, yang diperoleh dari Laboratorium LKM Depkes RI Jakarta. Binatang coba pada percobaan ini dilakukan induksi hipoksia dan kontrol normoksia yang dibagi menjadi enam kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol atau tanpa perlakuan dan lima kelompok lainnya adalah kelompok perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia 1, 3, 5, 7, dan 14 hari. Penelitian ini telah lolos uji etik.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Stress Oksidatif dan Laboratorium Biologi Molekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, jalan Salemba Raya Jakarta Pusat. Penelitian berlangsung sekitar 8 bulan.

3.3. Penetapan jumlah sample penelitian

Penetapan jumlah ulangan sample penelitian ditetapkan berdasarkan rumus Federer²⁰, yaitu:

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

Dimana t = jumlah perlakuan

n = jumlah sample

perlakuan dalam percobaan ini dibagi menjadi 6, maka nilai n dapat dihitung dengan rumus:

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n-6 \geq 15$$

$$n \geq 21/5$$

$$n \geq 4.2$$

jadi jumlah ulangan yang dapat digunakan minimal 5 binatang.

3.4. Perlakuan Hipoksia

3.4.1. Bahan

Gas campuran khusus dalam tangki gas yang digunakan mengandung Oksigen 8 % dan Nitrogen 92% (PT. Samator, Jakarta), makanan dan minuman tikus, serbuk gergaji untuk kandang tikus.

3.4.2. Alat

Sungkup hipoksia (*Plexyglass Hypoxic Chamber*) 2 set, ukuran besar dan kecil, masing-masing dengan kapasitas enam dan empat ekor tikus (Prof. Hui-Jin Chen, *Shanghai Institute for Pediatric Reseach*, Shanghai-P.R.China), *digital oxygen meter*, OX-12B, No. 05213, MIEI Shanghai-P.R. China, Tabung gas oksigen dan nitrogen dan pengatur tekanan aliran, timbangan (Sartorius), set alat untuk pembedahan tikus

3.4.3. Perlakuan

Sebelum perlakuan hipoksia, berat badan masing masing tikus ditimbang. Sungkup dipersiapkan untuk pemaparan lima kelompok perlakuan yaitu hipoksia 1,3,5,7,14 hari. Untuk optimasi kondisi hipoksia, gas campuran dialirkan dengan kecepatan 3 mL/menit selama 15 menit. Penurunan kadar oksigen diamati dengan oksigen meter dan kipas dinyalakan untuk menambah sirkulasi udara. Bila kadar oksigen sudah mencapai 8 %, kecepatan aliran gas diturunkan menjadi 1-2 mL/menit. Bila kondisi sungkup telah stabil selama 5-10 menit, tikus kemudian dimasukkan ke dalam sungkup dan waktu dicatat sebagai jam atau hari nol.

Selama perlakuan tikus mendapat makan dan minum *ad libitum*, disamping itu, setiap dua hari secara berkala sungkup dibersihkan, pakan dan minum diganti. Selama dibersihkan (5-10 menit), tikus dipindahkan ke sungkup kecil yang sudah dioptimasi dengan kondisi hipoksia (Gambar 3.1).

Pada akhir masa perlakuan, satu per satu tikus dikeluarkan dari sungkup lalu ditimbang. Setelah itu dimasukkan ke dalam sungkup kecil yang telah dioptimasi dan didalam sungkup kecil tersebut, tikus dikorbankan dengan menggunakan eter.

Dalam kondisi anestesi, dinding perut tikus dibuka sehingga tampak peritoneum. Peritoneum digunting dalam arah melintang sejauh-jauhnya. Selanjutnya beberapa organ dan juga darah dipisahkan untuk beberapa penelitian. Organ ginjal dipisahkan dari ruang retroperitoneal, ditimbang, dan sebagian disimpan pada lemari pendingin deep freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Gambar 3.1. Sungkup hipoksia

3.5. Isolasi DNA, RNA dan protein ginjal tikus.

Sebanyak 50-100 mg jaringan ginjal dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu ditambahi 1 mL TriPure Isolation Reagent dan dihomogenisasi. Setelah itu homogenat diinkubasi selama 5 menit pada suhu $15-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Setelah diinkubasi homogenat ditambahkan 0,2 ml CHCl_3 dan dikocok kuat selama 15 detik. Inkubasi diulangi lagi selama 2-15 menit pada suhu $15-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Untuk memisahkan protein, setelah diinkubasi homogenat disentrifuge 12000 g selama 15 menit pada suhu $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pada tahap ini dalam mikrotube terlihat tiga fase: fase air tidak berwarna dibagian atas mengandung RNA, sedangkan interfase dan fase organik berwarna merah dibagian bawah mengandung DNA dan protein.

Karena DNA dan protein tercampur pada interfase dan fase organik, maka keduanya harus dipisahkan dengan mengendapkan DNA. DNA diendapkan dengan menambahkan 0,3 mL EtOH 75%, kemudian dicampur rata dengan membolak-balik tabung. Inkubasi diulangi lagi pada suhu $15-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2-3 menit dan sentrifugasi 2000 g selama 5 menit pada suhu $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatan mengandung protein, fenol dan EtOH lalu dapat disimpan pada suhu $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protein dipisahkan dari fenol dan EtOH dengan cara presipitasi. Sebanyak 1,5 mL isopropanol ditambahkan ke supernatan fenol-EtOH dan tabung dibalik-balik beberapa kali, kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25 °C untuk mengendapkan 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 0,3 M guanidin HCl dalam EtOH 95%. 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.

Endapan protein yang telah dicuci 3 kali kemudian ditambahi 2 mL EtOH 100% lalu divorteks. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25 °C dan disentrifugasi 7500 g selama 5 menit pada suhu 2-8 °C. Supernatan dibuang, sedangkan kelebihan EtOH dibuang dengan pengering udara. Endapan protein dilarutkan dengan menambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 1% dalam aquadest dan memipet beberapa kali. Endapan 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 panjang gelombang 280 nm dan membandingkannya terhadap standar.

3.6. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan SDS-PAGE sesuai metode Laemmli

Bahan:

Isolate protein, akrilamid/bisakrilamid (30:1), tris HCl 1,5 M pH 8,6, tris HCl 0,5 M pH 6,8, aquades, SDS 10%, APS (*Ammonium Persulfate*) 10%, TEMED, dapar sample, β-merkaptotanol dan dapar elektroda 1x.

Alat:

Kit elektroforesis (Biorad), Power supply (Biorad), mikropipet dan tip berbagai ukuran, mikrotube, vortex, penangas air

Cara kerja:

Kit elektroforesis disusun, campuran untuk membuat gel dipersiapkan. Gel terdiri atas dua lapis, yaitu gel pemisah dibawah dan gel pemampat diatas. Gel pemisah dibuat dengan mencampur 9 mL akrilamid/bisakrilamid (30:1), 6,8 mL Tris HCl 1,5 M pH 8,6, 10,4 mL aquabides, 296 uL SDS 10%, 200 uL APS 10% dan 20 uL TEMED. Campuran gel pemisah dituang ke cetakan yang terbuat dari dua lempeng kaca sampai kurang lebih 3/4nya lalu dibiarkan mengeras. Selanjutnya dibuat campuran gel pemampat dengan mencampur 6,1 mL akrilamid/bisakrilamid, 4 mL Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 9,3 mL aquabides, 170 uL SDS 10% dan 150 uL APS 10% dan 15 uL TEMED. Campuran ini kemudian dituang ke cetakan kaca sampai penuh dan sisir pembuat sumur dipasang untuk membentuk sumur (Gambar 3.2).

Sampel berupa isolat protein disiapkan untuk elektroforesis. Volume sample disesuaikan sehingga total mengandung protein sebanyak 50 ug. Sampel dicampur dengan dapar sampel dan β merkaptotanol. Perbandingan dapar sampel dengan β merkaptotanol adalah 19:1. Sampel divorteks dan disentrifugasi secukupnya lalu dipanaskan pada suhu 95-100°C selama 3-5 menit.

Masing-masing sampel dan protein petanda dimasukkan ke dalam sumur dan di catat, kemudian alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* pada 90 Volt selama 3 jam 30 menit. Jalannya elektroforesis dapat dilihat dengan adanya pewarna (biru bromfenol) pada dapar sampel.



Gambar 3.2. Elektroforesis SDS-PAGE

3.7. Western Blot

Setelah elektroforesis dengan SDS-PAGE sampel (Kontrol, hipoksia 1, 3, 7 dan 14 hari, marker protein), maka dilakukan langkah-langkah berikut:

3.8.1. *Blotting*

Protein yang telah terpisah dalam gel di transfer ke kertas nitroselulosa (BioRad) dengan alat SemiDry Trans Blott (BioRad) selama 2 jam ,400mA (Gambar 3.3). Untuk memastikan transfer protein berhasil, maka dilakukan perendaman dengan Ponceau Red, yang memberikan hasil berupa pita-pita protein pada membran nitroselulosa. Protein petanda yang muncul berupa pita-pita protein pada membran nitroselulosa ditandai dengan menggunakan pena. Selanjutnya membran nitroselulosa dicuci dengan aquadest sampai warna merah dari Ponceau Red menghilang.



Gambar 3.3. Blotting

3.8.2. *Blocking* dengan larutan susu skim 10%

Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan susu skim 10%. Kemudian inkubasi selama 2 jam 37° C, lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali selama 5 menit.

3.8.3. Reaksi antigen-antibodi primer

Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan Antibodi primer (Anti HIF-1 α , Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:500). Setelah itu inkubasi selama semalam pada suhu 4 C $^{\circ}$, lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali .

3.8.4. Reaksi dengan Antibodi sekunder berlabel peroksidase

Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan Antibodi sekunder, anti IgG *Mouse* berlabel peroksidase (Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:1000), inkubasi selama 2 jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C , lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali.

3.8.5. Reaksi enzimatik

Reaksi enzimatik ini terdiri dari 2,5 ml aseton, 25 uL larutan H₂O₂ 30%, 3-Aminoethyl-Carbazole (Sigma Aldrich) dan buffer asetat 0,5 M pH 5,0. Rendam kertas nitroselulose dalam campuran senyawa di atas dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 20 menit atau semalam pada suhu 4 C $^{\circ}$, kemudian diperhatikan ada/tidak pita berwarna coklat.

3.8. qRT-PCR untuk penetapan kadar mRNA HIF-1 α dengan *iScript One Step RT-PCR with SYBR Green*.

Pada penelitian ini, sintesis cDNA dan amplifikasi dilakukan dengan alat miniOptikon (BioRad) dan *iScript One Step RT-PCR with SYBR Green*. Primer yang digunakan adalah:

HIF-1 α F, seq: 5'-ACA-GTG-GTA-CTC-ACA-GTC-GG-3' (SynthID 1346451)

HIF-1 α R, seq: 5'-CCC-TGC-AGT-AGG-TTT-CTG-CT-3' (SynthID 1346452)

β -aktinF, seq: 5'-ACC-ACA-GCT-GAG-AGG-GAA-ATC-G-3' (SynthID1346453)

β -aktinR, seq: 5'-AGA-GGT-CTT-TAC-GGA-TGT-CAA-CG3' (SynthID1346454)

Primer yang digunakan dari *1st BASE-1st BASE Pte Ltd, Singapore*. Primer HIF-1 α disusun berdasarkan sekuens HIF-1 α tikus (GenBank Accession no. AF057308), dan primer β -aktin berdasarkan sekuens β -aktin tikus (GenBank Accession no. NM_031144). Perkiraan panjang produk RT-PCR untuk HIF-1 α adalah 466 pasang basa, dan untuk β -aktin adalah 277 pasang basa.

Reaksi RT-PCR haruslah sensitive dan spesifik dan menghasilkan hasil amplifikasi yang baik. Untuk itu maka harus diperhatikan adalah mengetahui suhu annealing yang optimal dan membuat kurva standar untuk mengevaluasi hasil pemeriksaan.

Protokol reaksi:

Inkubasi campuran komponen dalam sistem deteksi *thermal real time* miniOpticon (BioRad) sebagai berikut:

Sintesis cDNA	10 menit pada 50° C
Inaktivasi Iscript Reverse Transcriptase	5 menit pada 95 °C
Siklus PCR dan deteksi (30-45 siklus)	10 detik pada 95 °C
	30 detik pada 60 °C
	30 detik pada 72 °C
	(Pengumpulan data)
<i>Melt Curve analysis</i>	1 menit pada 95 °C
	1 menit pada 55 °C
	10 detik pada 55 °C-95 °C

Untuk memeriksa spesifisitas reaksi RT-PCR dapat dilakukan analisa produk. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan fungsi *melting curve* (kurva lebur) pada instrument. Hasil yang baik haruslah menghasilkan satu puncak pada kurva lebur yang menunjukkan *melting temperature* (T_m , suhu dimana 50% dari pasangan duplex DNA terpisah) dari ampikon. Analisis melting curve ini juga dapat menunjukkan adanya dimer primer bila terdapat lebih dari satu puncak.

Untuk dapat menentukan suhu *annealing*, maka dilakukan optimasi pada primer HIF-1 α dan β aktin dengan percobaan pada beberapa gradient suhu. Bila terdapat suhu dimana memiliki nilai Ct terendah, maka suhu tersebut dapat dipilih.

Metode analisis data RT-PCR secara umum dibagi menjadi dua, yaitu kuantifikasi absolut dan kuantifikasi relatif. Kuantifikasi absolut didapat dari perbandingan nilai Ct sample dan kurva standar. Hasilnya adalah kuantitas dari asam nukleat (ug, jumlah copy) per jumlah sampel yang digunakan (per sel atau jumlah total RNA). Sementara analisis kuantifikasi relatif adalah dengan rasio

jumlah relatif asam nukleat target sejumlah yang sama dan kontrol sampel A dan B. Metode ini dipakai untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel normal dibandingkan dengan gen target pada kelompok perlakuan. Hasilnya dapat dilihat berupa peningkatan atau penurunan relatif gen target pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kalibratormya.

Kedua metode ini harus dinormalisasi agar data dapat bermakna secara biologis. Normalisasi pada metode kuantifikasi relatif dapat menggunakan gen referen. Gen referen adalah gen yang level ekspresinya konstan disemua sampel tes, dan dimana ekspresinya tidak dipengaruhi oleh perlakuan saat penelitian.

Dalam melihat tingkat ekspresi gen target pada kuantifikasi relatif, terdapat tiga metode yang menggunakan gen referen, yaitu:

1. Metode Livak atau dikenal dengan metode $2^{-\Delta\Delta CT}$
2. Metode ΔC_T yang menggunakan gen referen
3. Metode Paffl

Setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan. Pada metode Livak, syaratnya adalah baik gen target maupun gen referen memiliki efisiensi amplifikasi yang mendekati 100% dan berjarak 5% satu sama lainnya.

Pada percobaan ini digunakan metode Paffl, yang disebabkan efisiensi gen target dan gen referen yang tidak mendekati 100%.

Untuk perhitungan metode Paffl, digunakan rumus:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T, \text{target}} (\text{calibrator-test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T, \text{ref}} (\text{calibrator-test})}}$$

E = efisiensi amplifikasi gen target dan referen

C_T = jumlah siklus dimana amplikon yang dihasilkan memberikan sinyal yang dapat terdeteksi

Calibrator = kontrol

Gen referen = β aktin

3.9. Analisis Statistik

Data diolah dengan menggunakan software SPSS 16.0 dengan uji normalitas data menggunakan uji Kolmogorov –Smirnov. Berdasarkan hasil tersebut, maka dipilih uji statistik dengan metode Kruskal Wallis untuk menguji perbedaan dan uji statistik Spearman's Rho untuk menguji hubungan antara masing-masing kelompok perlakuan. Perbedaan antara variabel dinyatakan bermakna jika $p < 0.05$.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ginjal merupakan organ yang secara fisiologis berada pada kondisi hipoksia. Tekanan oksigen ginjal berkisar antara 10-30 mmHg. Hal ini disebabkan struktur anatomis vaskularisasi ginjal yang memungkinkan terjadinya difusi oksigen antara pembuluh darahnya.^{2,12-16}

Penelitian ini dilakukan menggunakan *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 8% dan nitrogen 92 % selama 14 hari .Dari penelitian Ferdinal et al yang menggunakan objek penelitian yang sama, diperoleh hasil analisis gas darah yang diambil dari aorta saat dilakukan pembedahan. Terlihat adanya penurunan parameter yang mengindikasikan telah terjadinya hipoksia dengan melihat penurunan tekanan parsial O₂, pCO₂, dan saturasi oksigen yang sejalan dengan lamanya hipoksia.

Tabel 4.1. Hasil analisis gas darah dan berat hewan coba

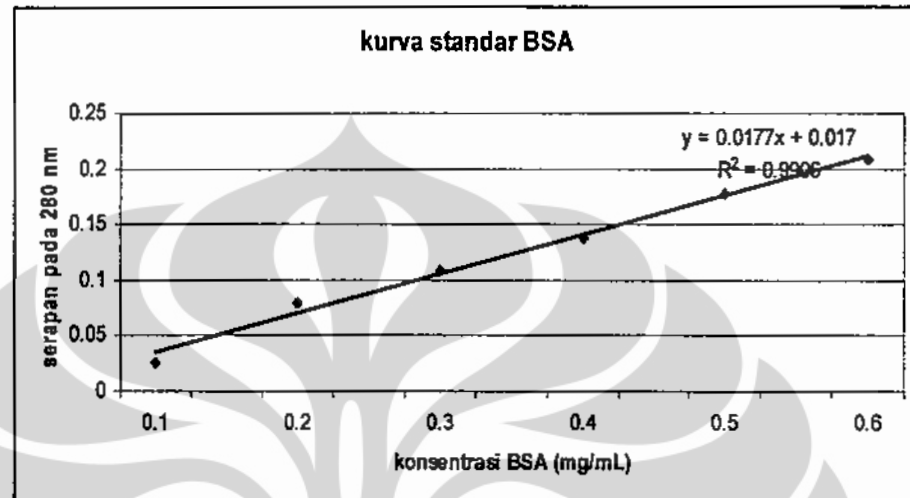
parameter	normoksia	hipoksia					
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari	21 hari *	28 hari*
pO ₂ arteri , mmHg	96.4± 4.8	56.2± 6	51± 5.2	44.6± 4	35.6± 3.1	30.1± 4.5	24.7± 2.6
pCO ₂ arteri, mmHg	40.4 ±2.7	36.2± 2.2	33.3± 2.2	29± 3.3	23.7± 2.4	20.1± 1.9	18.2± 3.4
saturasi O ₂ arteri,%	94.1±3.1	65.2± 6.2	60.2± 5.5	57.3± 5.4	52.9± 8.6	36.3± 5.7	25.2± 5.4
pH	7.39± 0.01	7.4± 0.02	7.4± 0.01	7.4± 0.02	7.37± 0.01	7.36± 0.02	7.36± 0.02
BB akhir, g	178	175	209	206	210	*	*
Berat rata-rata ginjal, mg	612	617	745	754	767	*	*
Rasio BG/BB (mg/g)	3.44	3.52	3.56	3.66	3.65	*	*

Tabel analisis gas darah dikutip dari penelitian Ferdinal et al dari proyek hipoksia yang sama.

* tidak termasuk kelompok penelitian

4.1. Kadar protein jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.

Perhitungan protein jaringan ginjal tikus dilakukan pada tiap sampel berdasarkan kurva standar protein *Bovine Serum Albumine* (BSA) (Gambar 4.1).



Gambar 4.1. Kurva standar BSA (*Bovine serum Albumin*)

Hipoksia adalah suatu kondisi yang akan mempengaruhi sel-sel ginjal dalam kelangsungan hidupnya. Untuk itu sel harus dapat bertahan dengan melakukan mekanisme adaptasi atau bila hal tersebut sudah tidak mampu dikendalikan maka akan terjadi kematian sel.

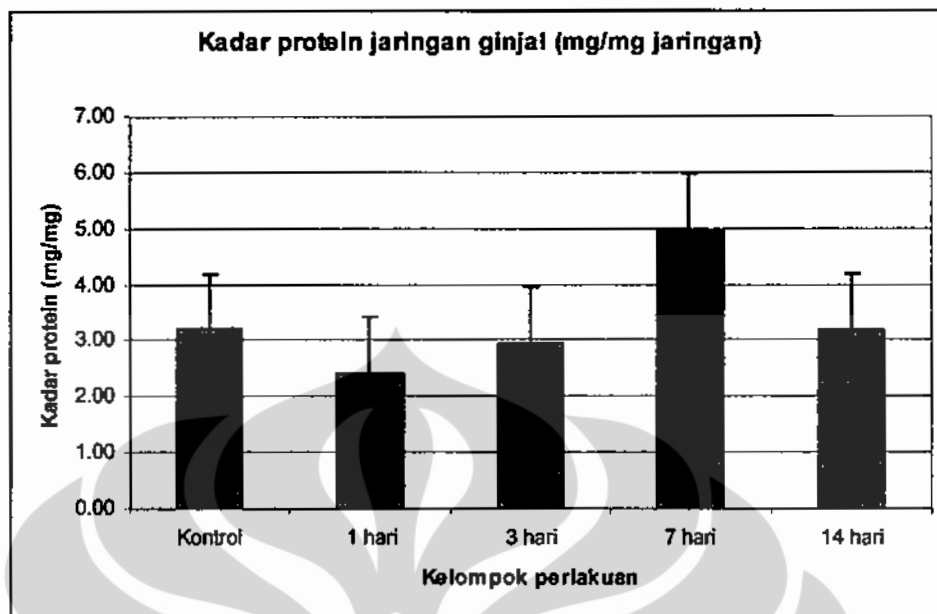
Dari persamaan ini, setelah dikoreksi dengan pengenceran yang dilakukan, didapat kadar protein jaringan ginjal (mg/mg jaringan) pada masing masing sampel seperti tabel 4.2. di bawah ini

Tabel 4.2. Kadar protein jaringan ginjal tikus pada kelompok kontrol, hipoksia 1 hari, 3 hari, 7 hari, dan 14 hari.

	kdr protein (mg/mg jaringan)	Mean±St.Dev	SEM
Kontrol	0.1905	0.192±0.047	0.019
	0.2583		
	0.1250		
	0.1714		
	0.1792		
	0.2330		
1 hari	0.2034	0.174±0.032	0.013
	0.1880		
	0.1340		
	0.2129		
	0.1492		
	0.1561		
3 hari	0.1721	0.218±0.028	0.113
	0.1981		
	0.2407		
	0.2435		
	0.2308		
	0.2234		
7 hari	0.3270	0.2618±0.068	0.028
	0.2406		
	0.1669		
	0.2425		
	0.2392		
	0.3557		
14 hari	0.1990	0.24±0.095	0.039
	0.1865		
	0.1870		
	0.2137		
	0.4331		
	0.2253		

$p > 0.05$: tidak terdapat perbedaan bermakna antara kadar protein pada masing-masing kelompok perlakuan.

Adaptasi sel terhadap kondisi hipoksia ini dapat terlihat dari perubahan protein pada masing-masing kelompok seperti terlihat pada gambar 4.2 berikut:



Gambar 4.2. Diagram batang kadar protein jaringan ginjal pada kelompok normoksia, hipoksia 1,3,7 dan 14 hari. $p > 0.05$

Secara statistik, tes normalitas dengan Uji Kolmogorov Smirnov menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal, Analisis lalu dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan metode Kruskal Wallis yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar protein antar kelompok ($p > 0.05$). Namun bila dilihat gambar 4.2. dapat terlihat perbedaan yang cukup signifikan antara kelompok perlakuan.

Berdasarkan grafik kadar protein (gambar 4.2.), terlihat peningkatan kadar protein seiring dengan lamanya hipoksia. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena adanya proses adaptasi sel ginjal terhadap kondisi hipoksia. Pada hipoksia satu hari, terlihat sedikit penurunan kadar protein dibandingkan kontrol, yang mungkin disebabkan oleh respon awal sel terhadap hipoksia yang ditandai dengan penurunan metabolisme dan penghematan energi yang ada.^{29,37} Namun seiring dengan lamanya hipoksia, akan terjadi adaptasi sel diantaranya melalui penurunan katabolisme protein, pemanjangan waktu paruh protein, dan stabilisasi HIF-1 α sebagai *master gene* yang mengatur ± 100 gen untuk proses adaptasi terhadap hipoksia.

Hal ini terlihat pada hasil *Western Blot* protein HIF-1 α (Gambar 4.3). Pada gambar, terlihat ekspresi protein HIF-1 α yang ditandai dengan pita berwarna

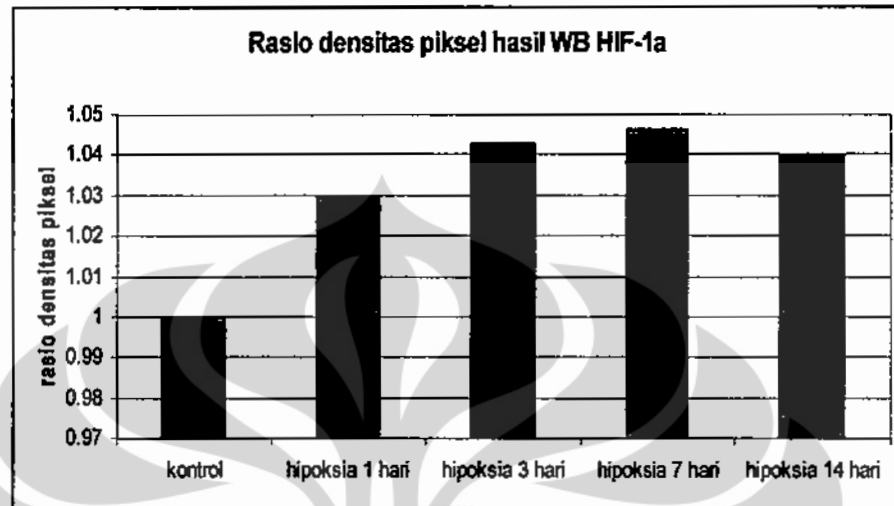
kecoklatan. Pada kelompok kontrol (K), sudah dapat terlihat pita kecoklatan yang lebih tipis bila dibandingkan dengan pita-pita dari kelompok hipoksia. Hal ini memang dapat terjadi disebabkan memang dalam kondisi fisiologis ginjal merupakan organ yang relatif hipoksia, sehingga terdapat ekspresi protein HIF-1 α dalam jumlah yang kecil. Pada kelompok hipoksia, terlihat pita semakin tebal yang menandakan semakin meningkatnya jumlah protein HIF-1 α yang memang mengalami stabilisasi pada kondisi hipoksia 1,3,dan 7 hari, namun pada kondisi hipoksia lebih lanjut, yaitu pada 14 hari, stabilisasi HIF-1 α sudah tidak sejelas kelompok hipoksia sebelumnya yang mungkin disebabkan karena jumlahnya yang mulai sedikit karena sudah ada yang mengalami degradasi oleh kompleks proteasom.



Gambar 4.3. Hasil foto *Western Blot* protein HIF 1 α ginjal tikus kelompok kontrol dan kelompok hipoksia sistemik

HIF-1 α memiliki berat molekul 120 kDa, namun pada hasil *Western blot* ini terdapat dua pita (tanda panah) yaitu pada berat molekul 66.200 Da dan 45.000 Da, yang mungkin disebabkan telah terpecahnya molekul protein HIF-1 α karena masih terdapatnya protease sel dalam sampel.

Pada perhitungan rasio rata-rata densitas piksel hasil *Western Blot* HIF-1 α menggunakan *software Adobe Photoshop CS2* (lampiran 1), didapatkan hasil seperti gambar berikut:



Gambar 4.4. Diagram batang rasio densitas pada foto *Western Blot* HIF-1 α .

Stabilisasi HIF-1 α disebabkan oleh tidak aktifnya enzim prolin hidroksilase yang membutuhkan oksigen sebagai salah satu substratnya. Ketidakaktifan enzim prolin hidroksilase akan menyebabkan HIF-1 α tidak mengalami hidroksilasi pada residu prolin sehingga tidak dapat dikenali oleh pVHL dan berakibat tidak dapat didegradasi oleh kompleks proteasom. HIF-1 α akan berdimer dengan HIF-1 β membentuk HIF-1 yang merupakan faktor transkripsi bagi banyak gen yang mengatur respon adaptif terhadap hipoksia. Stabilisasi HIF-1 α ini akan terus berlangsung sepanjang sel tersebut mampu untuk mempertahankan diri pada kondisi hipoksia. Bila sel tersebut sudah tidak mampu lagi mempertahankan respon adaptif tadi, maka sel tersebut akan mengalami apoptosis.

4.2. Kadar RNA Total

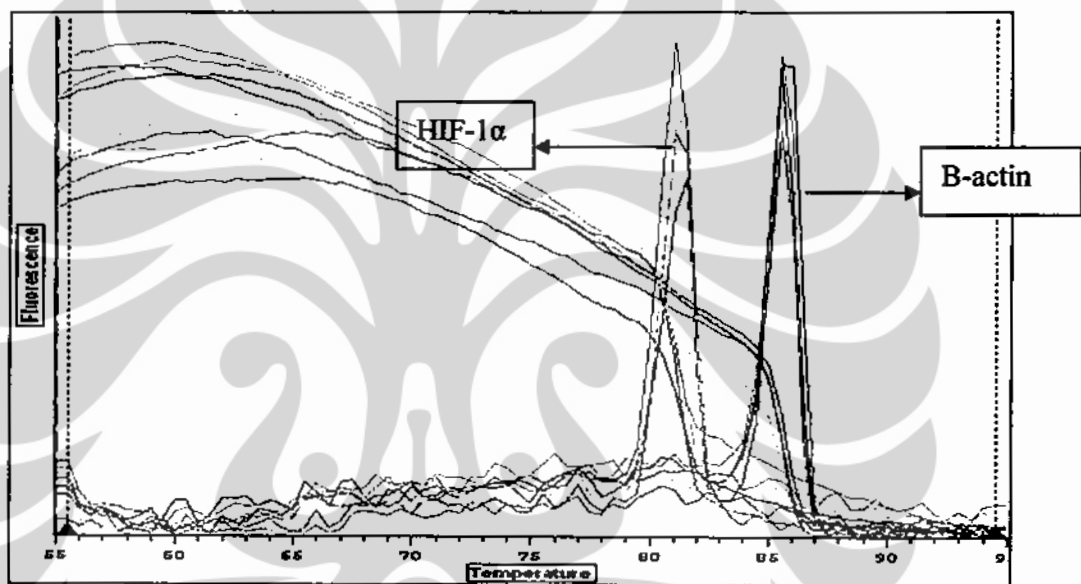
Penentuan kandungan RNA total dilakukan dengan pembacaan serapan pada 260 nm. Kadar RNA total ini digunakan untuk menyamakan jumlah RNA yang akan digunakan pada RT-PCR. Pada tehnik ini, diperlukan RNA tiap sample yang lebih kurang sama yaitu ± 550 ug tiap. Kadar RNA total dan hasil serapannya dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.3. Kadar RNA Total

	Serapan	RNA total	Mean \pm SD	SE
	A260	μ g/mL		
Kontrol	0.029	1160	1590 \pm 396	161.90
	0.034	1360		
	0.033	1320		
	0.053	2120		
	0.033	1320		
	0.049	1960		
1 Hari	0.05	2000	2373 \pm 489	199.60
	0.05	2000		
	0.067	2680		
	0.05	2000		
	0.085	3200		
	0.059	2360		
3 Hari	0.054	2160	1993 \pm 336	137.60
	0.054	2160		
	0.035	1400		
	0.046	1840		
	0.059	2360		
	0.051	2040		
7 Hari	0.052	2080	1886 \pm 569	232.60
	0.048	1920		
	0.065	2600		
	0.025	1000		
	0.056	2240		
	0.037	1480		
14 Hari	0.037	1480	1620 \pm 602	245.80
	0.062	2480		
	0.021	840		
	0.028	1120		
	0.044	1760		
	0.051	2040		

4.3. Rasio mRNA HIF-1 α jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.

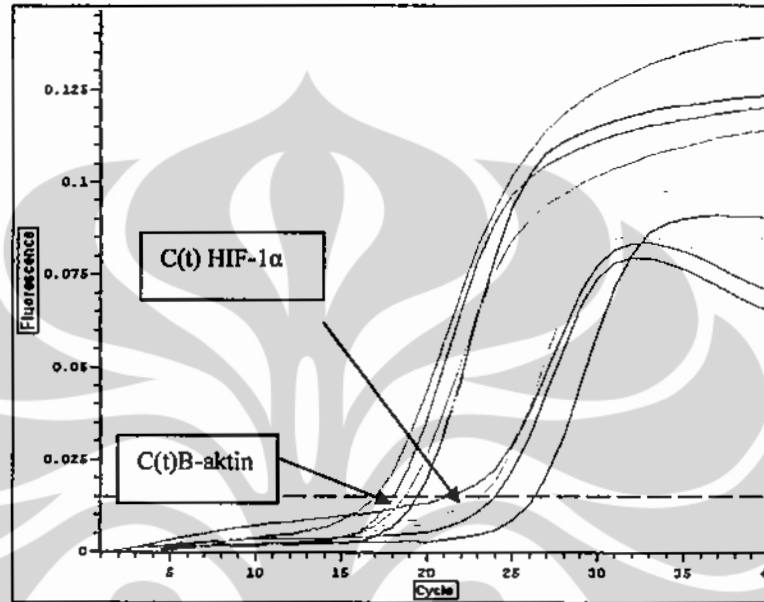
Sebelum RT-PCR mRNA HIF-1 α dijalankan, terlebih dahulu dilakukan optimalisasi dengan mencari suhu *annealing* dan melihat *melting curve* menggunakan primer HIF-1 α dan primer β aktin. Primer HIF-1 α memiliki T_m 58°C dan T_m untuk primer β aktin adalah 62°C, sehingga untuk menjalankan RT-PCR ditentukan suhu 60°C. Primer yang digunakan menunjukkan kespesifikan dengan melihat hasil *melting curve* keduanya yang menunjukkan satu puncak sehingga cukup layak digunakan.



Gambar 4.5. *Melting curve* beta aktin dan HIF

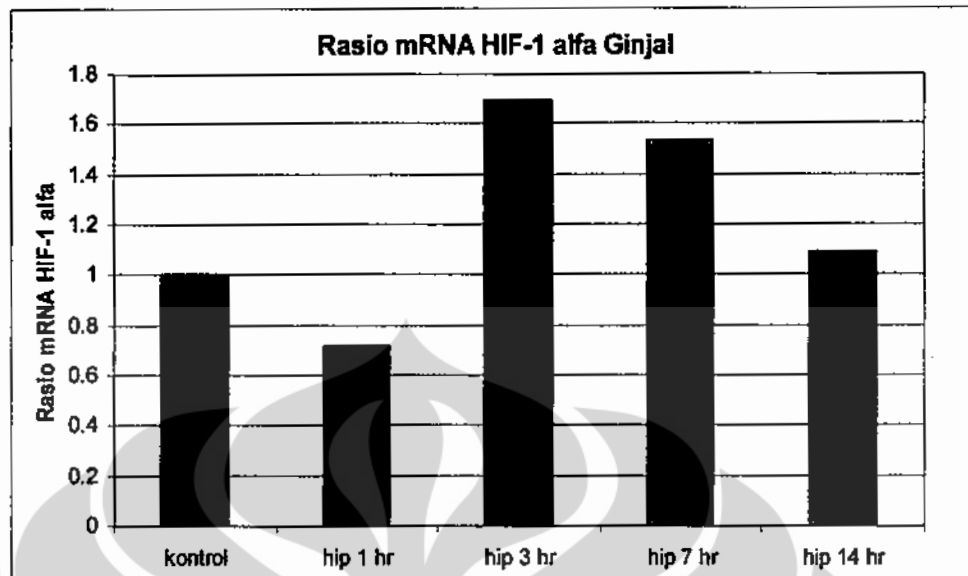
Langkah selanjutnya adalah menjalankan RT-PCR yang diikuti dengan analisis hasil RT-PCR. Metode analisis RT-PCR yang digunakan pada percobaan ini adalah relatif kuantitatif, yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel yang normal dibandingkan dengan sel yang mengalami perlakuan. Melalui metode ini dapat ditentukan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel target apakah meningkat atau menurun dibandingkan dengan sel normal (kontrol).

Dari hasil RT-PCR yang didapatkan, terlihat nilai efisiensi yang sangat bervariasi. Tingkat ekspresi relatif mRNA HIF-1 α ditentukan berdasarkan rumus Pfaffl.²² Selain nilai efisiensi, terdapat nilai lain yang diperlukan dalam analisis hasil RT-PCR, yaitu C(t). Nilai C(t) ditentukan oleh alat Real Time RCR secara otomatis berdasarkan perpotongan kurva dengan garis *threshold*.



Gambar 4.6. C(t) β -aktin dan HIF-1 α

Analisis data RT-PCR mRNA HIF-1 α menggunakan metode Pfaffl yang didasari atas ketidakseragaman efisiensi amplifikasi antara gen target (HIF-1 α) dan gen referen (β -aktin).²² Hasil perhitungan rasio mRNA HIF-1 α menggunakan metode Pfaffl dapat dilihat pada lampiran tiga. Dari hasil yang didapat, terlihat adanya peningkatan rasio ekspresi mRNA HIF-1 α yang terlihat pada gambar berikut:



Gambar 4.7. Diagram batang rasio mRNA HIF-1 α pada kelompok normoksia, hipoksia 1,3,7 dan 14 hari.

Pada gambar 4.7, sudah terdapat ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok kontrol. Hal ini disebabkan bahwa pada kondisi fisiologis ginjal memang relatif berada dalam kondisi hipoksia. Pada awal hipoksia, terjadi penurunan rasio dibandingkan kontrol. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya respon awal sel melalui penurunan metabolisme dan energi. Peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α terjadi sebanyak 1,6 kali lipat dibanding kontrol pada kelompok hipoksia 3 hari, 1,5 kali lipat pada 7 hari dan 1,09 pada hipoksia 14 hari.

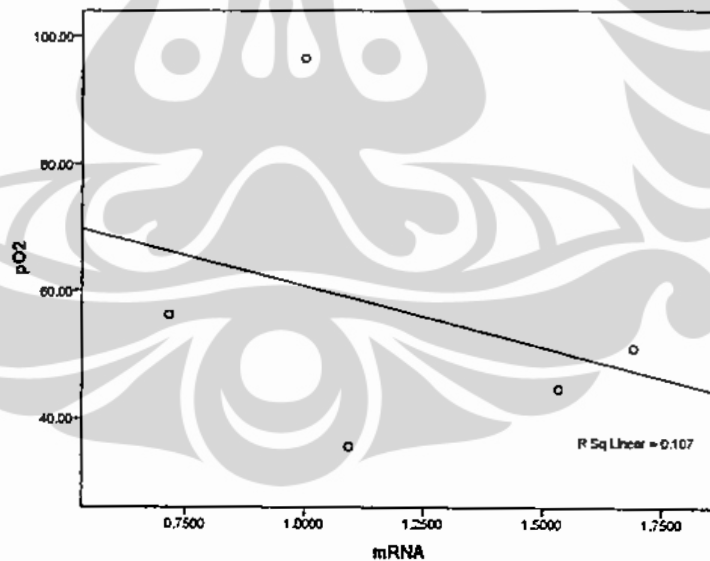
Terdapatnya ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok kontrol (normoksia), dapat disebabkan oleh karena kondisi fisiologis jaringan ginjal yang relatif hipoksia, hal ini juga dapat terlihat pada penelitian Heidbreder et al, 2003 yang memberikan hasil yang sama dimana terdapatnya ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok normoksia ginjal.²⁷ Kondisi hipoksia lanjut (3 hari), mulai terlihat sel yang mengalami adaptasi sehingga ekspresi mRNA HIF-1 α terjadi peningkatan. Peningkatan rasio ekspresi mRNA dapat disebabkan karena adanya respon adaptasi sel untuk tetap bertahan pada kondisi hipoksia. Respon adaptif ini dimotori oleh HIF-1 α karena protein ini memang merupakan suatu *master gene* yang mengatur banyak gen dalam kondisi hipoksia, diantaranya gen untuk

eritopoesis, angiogenesis, metabolisme an aerob karbohidrat, proliferasi sel dan apoptosis.¹¹

Pada kondisi hipoksia 7 dan 14 hari mulai terjadi penurunan ekspresi HIF-1 α bila dibandingkan kelompok hipoksia 3 hari namun tetap lebih tinggi bila dibandingkan kontrol. Penurunan ekspresi ini dapat disebabkan oleh mulai adanya penekanan ekspresi mRNA HIF-1 α oleh protein HIF-1 α yang sudah banyak terstabilisasi atau karena sel sudah mulai kehilangan daya adaptasinya terhadap hipoksia.²⁸

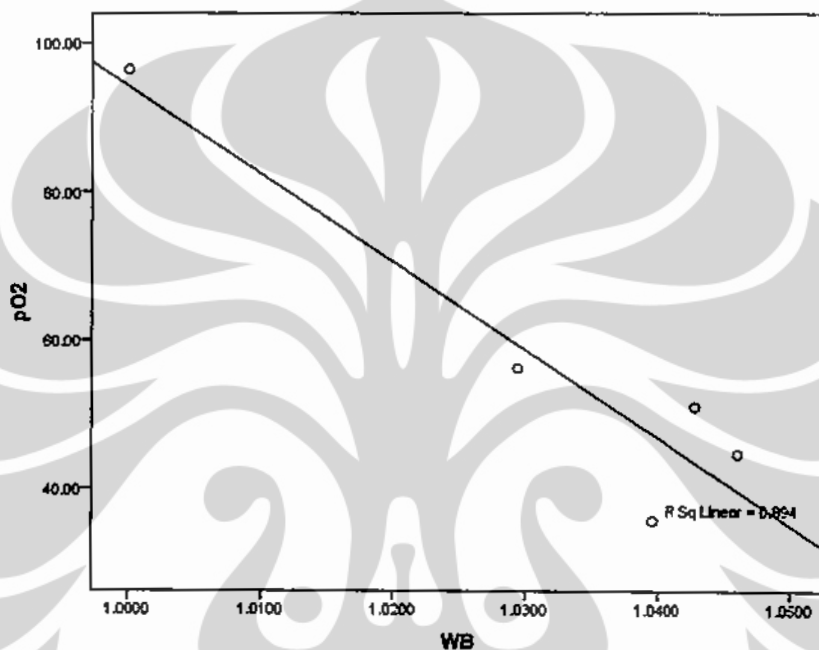
4.4. Hubungan antara mRNA, protein HIF-1 α dan pO₂

Untuk dapat melihat apakah terdapat hubungan korelasi antara hipoksia dengan kadar mRNA HIF-1 α , dilakukan analisis korelasi menggunakan metode Spearman's Rho. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif sedang ($R=-0.5$, $p>0.05$) yang menggambarkan bahwa semakin rendah pO₂, semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 α dan tidak terdapat hubungan bermakna antar kadar pO₂ dan mRNA HIF-1 α (Gambar 4.8).



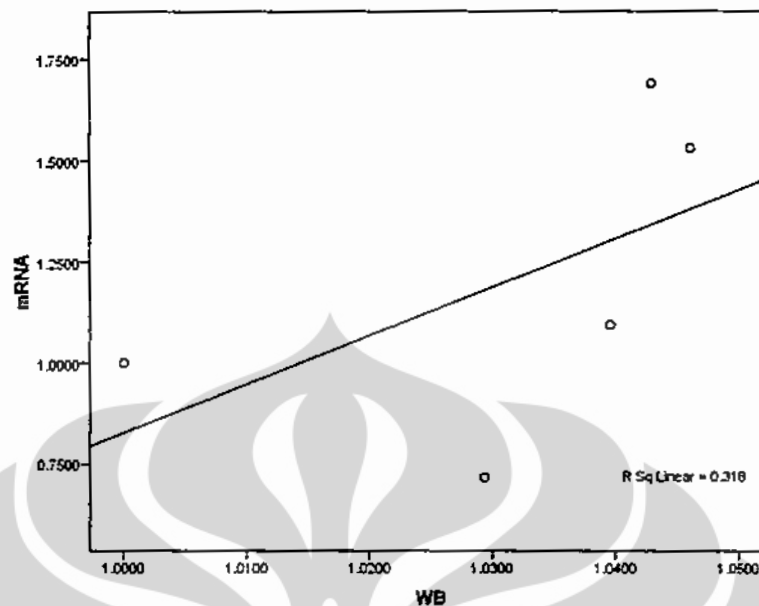
Gambar 4.8. Diagram *Scatter* untuk korelasi pO₂ dengan mRNA HIF-1 α ginjal

Sementara untuk korelasi pO_2 dengan hasil *Western Blot* dengan uji korelasi Spearman's Rho (Gambar 4.9), terdapat korelasi negatif yang kuat dan terdapat perbedaan bermakna antar kadar saturasi O_2 dan hasil *Western Blot* ($R=-0.7$, $p>0.05$). Analisis ini menggambarkan bahwa semakin rendah kadar tekanan parsial O_2 , semakin tinggi ekspresi HIF-1 α yang tergambar dari nilai densitasnya dan tidak terdapat hubungan bermakna antara kadar saturasi O_2 dan hasil *Western Blot* HIF-1 α .



Gambar 4.9. Diagram *scatter* untuk korelasi pO_2 dengan hasil *Western Blot* HIF-1 α ginjal

Untuk korelasi antara hasil *Western Blot* dengan rasio mRNA, juga dilakukan analisis dengan korelasi Spearman's Rho yang menunjukkan hasil adanya korelasi sangat kuat ($R=0.8$) dan $p>0.05$. Korelasi bernilai positif yang menunjukkan bahwa semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 α , semakin tinggi nilai densitas hasil *Western Blot* HIF-1 α namun tidak terdapat hubungan bermakna antar keduanya (Gambar 4.10.)



Gambar 4. 10. Diagram *scatter* untuk korelasi mRNA dan Hasil Western Blot HIF-1 α ginjal.

Oksigenisasi pada parenkim ginjal menggambarkan adanya keseimbangan antara pasokan oksigen dan konsumsinya, terutama untuk transport di tubulus. Kebutuhan O₂ diatur oleh Laju Filtrasi Glomerulus/ *Glomerular Filtration Rate* (GFR), jumlah pompa ion, dan berbagai macam regulator yang mengatur aktifitas transport.³¹

Secara fisiologis, ginjal adalah organ yang hipoksia dan memiliki rasio konsumsi berbanding pasokan yang terendah dibandingkan dengan organ lain.³² Terdapatnya gradien ketersediaan O₂ memang dibutuhkan ginjal untuk menjalankan berbagai macam fungsi fisiologisnya. Hal ini menjelaskan bahwa pada kelompok kontrol (normoksia) penelitian ini memang terdapat ekspresi mRNA HIF-1 α dan protein HIF-1 α yang merupakan protein yang terekspresi pada kondisi hipoksia. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Stroka et al, 2001 yang menyatakan bahwa protein HIF-1 α terdapat pada kondisi normoksia di jaringan otak, ginjal, hati dan jantung dengan metode imunohistokimia.³⁷ Tekanan oksigen fisiologis pada jaringan yang mungkin menyebabkan protein HIF-1 tetap ada dalam jumlah kecil untuk mempertahankan homeostasis jaringan.³⁷ Diduga bahwa HIF-1 yang berada pada kondisi normoksia jaringan berfungsi untuk mempertahankan ekspresi gen pada tingkat basal dalam rangka pemenuhan energi

sel. Selain itu ekspresi HIF tidak hanya menggambarkan kondisi patologis.. Penelitian Haase et al, 2006, mengemukakan bahwa hipoksia terjadi selama embriogenesis normal dalam kondisi fisiologis.

Penelitian ini memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α sejalan dengan lamanya hipoksia yang juga diikuti oleh peningkatan kadar protein HIF-1 α yang mengalami stabilisasi selama sel masih dapat bertahan untuk hidup.

Pada kondisi hipoksia kronis, stabilisasi HIF juga dilaporkan oleh Manotham et al, 2005 dengan metode imunohistokimia yang mendeteksi adanya HIF-1 α pada medulla ginjal.³³ Lidgren et al, 2008 melaporkan adanya peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α pada pasien *Renal Clear Carcinoma* yang juga mengalami hipoksia jaringan.

Adanya penurunan ekspresi mRNA HIF-1 α juga dilaporkan oleh Belaiba et al, 2007 yang melaporkan bahwa pada model hipoksia 10% O₂ pada paru tikus didapatkan peningkatan mRNA HIF-1 α hingga hipoksia 1 jam yang diikuti dengan penurunan mRNA HIF-1 α , namun ekspresi protein semakin meningkat hingga hipoksia 16 jam.³⁴ Lidgren et al, 2008 juga melaporkan hal yang sama pada ekspresi mRNA HIF-1 α pasien *Renal Clear Carcinoma*. Hal ini dapat disebabkan oleh karena adanya up-regulasi protein HIF-1 α , yaitu adanya akumulasi faktor transkripsi dan akhirnya dapat menekan ekspresi mRNA HIF-1 α pada tingkat tertentu.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme adaptasi hipoksia yang tergantung HIF-1 α bukan hanya disebabkan oleh peningkatan stabilitas protein HIF-1 α namun juga sebagai akibat dari peningkatan mRNA HIF-1 α atau terjadi regulasi pada tingkat transkripsi dan pascatranslasi.²⁶

Terjadinya penurunan ekspresi HIF-1 α dapat disebabkan oleh adanya ketidakmampuan sel dalam melakukan adaptasi terhadap hipoksia sehingga sel akan mengalami apoptosis atau nekrosis. Banyak sekali mediator untuk terjadinya apoptosis termasuk juga perubahan pH intrasel, radikal bebas, dan deplesi energi (ATP). Dagher PC et al, 2004, mengemukakan bahwa deplesi energi dan aktivasi p53 adalah pencetus utama kematian sel terprogram.³⁸ Selain itu, Saikumar et al, 2003, menyatakan bahwa pada sel ginjal yang mengalami hipoksia, Bax dan Bak, 2 protein *pro-apoptotic* dari *Bcl-2 family*, bekerja sama untuk membuat membran

luar mitokondria menjadi permeabel terhadap protein Cyt c. Selanjutnya Cyt c akan merangsang kaskade apoptosis.³⁹ Pada kondisi ini, HIF-1 α akan diikat oleh MDM2 dan didegradasi oleh proteasom 26S tanpa melibatkan pVHL.²⁶

Hipoksia pada ginjal mengarah pada efek yang diinginkan maupun yang tidak diinginkan yang akhirnya pada banyak kasus mengarah pada terjadinya progresifitas gagal ginjal kronis. Heymen at al, 2008 mengemukakan terdapatnya dua faktor utama yaitu hipoksia dan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mengalami induksi dalam kondisi hipoksia. Hal ini menginisiasi faktor transkripsi baik HIF maupun non-HIF, serta efektor host yang digolongkan sebagai mediator berbahaya dan mediator pelindung yang berperan dalam hasil akhir kondisi ginjal. Mereka berperan dalam sejumlah proses patofisiologis dalam partisipasinya pada progresifitas Gagal Ginjal Kronis. Diantara mediator yang berbahaya adalah poros Renin-Angiotensin-Aldosteron, endotelin, *plasminogen activator-inhibitor I*, molekul adhesi, dan *Growth Factor* yang dengan adanya hipoksia memicu terjadinya disfungsi endotel, vasokonstriksi, deplesi mikrovaskular, inflamasi, fibrosis dan kerusakan tubulus dan glomerulus. Berlawanan dengan hal itu, hipoksia juga dapat memicu efek proteksi, seperti eritropoesis dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), yang dengan cara tertentu menangkis efek berbahaya dengan cara angiogenesis, perbaikan oksigenasi jaringan dan daya hidup sel, serta memfasilitasi *homing* dari sel-sel progenitor. Akhirnya, mediator mana yang menentukan tergantung dari besarnya intensitas ekspresi dan kerja mediator tersebut.^{12,14-15, 31, 35-36}

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang terbalik antara lamanya hipoksia (dinyatakan dalam perubahan tekanan parsial O₂ dalam darah) dengan jumlah mRNA HIF-1 α dan jumlah protein HIF-1 α pada ginjal. Hubungan antara perubahan mRNA HIF-1 α dengan ekspresi protein HIF-1 α merupakan hubungan positif kuat.

Ini menunjukkan bahwa mekanisme adaptasi hipoksia pada ginjal tidaklah sederhana dan disebabkan oleh dua mekanisme. Peningkatan stabilitas protein HIF-1 α dipengaruhi oleh ekspresi mRNA HIF-1 α dan oleh PHD yang tidak aktif. Ini berarti bahwa regulasi HIF-1 α terjadi pada tingkat transkripsi dan pasca translasi.

2. Saran

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas proteasom dan aktivitas enzim Prolil Hidroksilase (PHD) pada kondisi ini sehingga dapat lebih diketahui mekanisme secara molekuler dalam proses adaptasi terhadap hipoksia sistemik kronis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bruick, R. K. Oxygen sensing in hypoxic response pathways: regulation of the Hypoxia Inducible Transcription Factor. *Gene and development*. 2003; 17: 2614-2623.
2. Nangaku, M., Nishi, H., Miyata, T. Role of chronic hypoxia and hypoxia Inducible Factor in kidney disease. *Chinese Med. J.* 2008; 121 (3): 257-264.
3. Huang, L. E., Bunn, H. F. Hypoxia Inducible Factor and its biomedical relevance. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (22): 19575-19578.
4. Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R. et al. Protective role of hypoxia Inducible Factor 2 α against ischaemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 1218-1226.
5. Corn, P. G. Role of the ubiquitin proteasom system in renal cell carcinoma. *BMC Biochemistry*. 2007; 8 (1): S4.
6. Thomas, J. D., Johannes, G. J. Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA J.* 2007; 13 : 1116-1131
7. Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann R, Jr., et al. RNA binding protein HuR and PTB promote the translation of HIF 1. *Mol Cell Biol*. 2008; 28 (10) : 93-107.
8. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *Journal of molecular medicine*. 2007; 85 (12): 1325-1330.
9. Semenza, GL. HIF 1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88:1474-1480
10. Weinberg, JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney International*. 1991; 39: 476-500
11. Ke, Q; Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1469-1480
12. Haase, VH. HIF in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291: 271-281
13. O'Connor, PM. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2006; 33: 961-967

14. Nangaku, M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 17-25
15. Nangaku, M, Fujuta, T. Activation of renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens res.* 2008; 31: 175-184
16. Weidwmann, A, et al. HIF activation protect from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 486-494
17. Wang, GL, et al. HIF 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad sci USA.* 1995; 92: 5510-5514
18. Wang, GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *Journal of biological chemistry.* 1995; 20: 1230-1237
19. Nangaku, M. The heat is on: expanding role for Hypoxia-Inducible Factor in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:13-15
20. Srigondo B. Jumlah Ulangan dalam percobaan, dalam rancangan percobaan. Semarang: Universitas Diponegoro: 1981.
21. Soewoto H, M.Sadikin, M.M.Vita K, Septelia IW, Dwirini RG, Parwati AS, et al. Biokimia Eksperimen Laboratorium. Jakarta: Widya Medika, 2001:1-6
22. Bio-Rad Laboratorium. RT- PCR application guide book
23. Bio-Rad. Transblot guide book
24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sd USA.* 1979; 76: 4350-4354
25. Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112(2):195-203.
26. Ferdinal F, et al. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran Hypoxia Inducible Factor-1 dalam regulasi ekspresi gen B-Type Natriuretic Peptide-45. Disertasi S3 biokimia dan Biologi Molekuler. Jakarta; FKUI; 2008.
27. Heidbreder, M; et al. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *The FASEB Journal. express article.* 2003. 10.1096/fj.02-0936fje.

28. Lidgren ,A, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α mRNA and Protein Levels in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer Molecules*. 2008; 4(5): 153-157.
29. Zou AP, Yang ZZ, Li PL, Cowley AW JR. Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1 α in renal medullary cells of rats. *Physiol Genomics*. 2001; 6(3):159-68.
30. Li HG, Ren YM, Guo SC, Cheng L, Wang DP, Yang J, Chang ZJ, Zhao XQ. The protein level of hypoxia-inducible factor-1 α is increased in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) inhabiting high altitudes. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol*. 2009; 311(2): 134-41
31. Heymen SN, et al. Renal Parenchymal Hypoxia, Hypoxia response and the Progression of Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol*. 2008; 28: 998-1006
32. Eipstein FH, Oxygen and Renal Metabolism. *Kidney International*. 1997; 51: 381-385
33. Manotham K, et al. A Biologic Role of HIF-1 α in the Renal Medulla. *Kidney International*. 2005; 67(4): 1428-29
34. Rachida S. BelAiba, et al. Hypoxia Up-Regulates HIF-1 transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor-B in Pulmonary Artery Smooth Muscle cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2007; 18: 4691-4697
35. Eckardt KU, et al. Hypoxia Inducible Factors and their role in renal disease. *Semin Nephrol*. 2007; 27(3): 363-72
36. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia anf HIF System in the kidney disease. *Journal of Molecular Medicine*. 2007; 85(12): 1325-1330
37. Storey KB, Storey JM. Oxygen limitation and metabolic rate depretion. In: Storey KB, Editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons; 2004. 319-84
38. Stroka DM, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-spesific regulation under systemic hypoxia. *FASEB Journal*. 2001; 15: 2445-2453
39. Dagher PC. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int* .2004; 66(2):506-9
40. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol*. 2003; 23(6):511-21

Lampiran 1. Kadar protein jaringan ginjal dan rata-rata densitas hasil Western Blott HIF-1 α jaringan ginjal

Kelompok	Absorbansi	Kadar protein (mg/ml)	mg jar	Kdr protein (mg/mg jaringan)	Mean \pm St.Dev	SEM	Mean densitas	
Kontrol	KA	0,223	3,2	84	0,19047619	0,192 \pm 0,047	0,01928	144,8
	KB	0,215	3,1	60	0,268333333			
	C2	0,117	1,7	68	0,126			
	C3	0,165	2,4	70	0,171428571			
1 hari	C4	0,132	1,9	53	0,179245283			
	KG1	0,171	2,47	53	0,233018868			
	D	0,165	2,4	59	0,203389831	0,174 \pm 0,032	0,01304	149,05
	E	0,216	3,12	83	0,187951807			
3 hari	F	0,150	2,17	81	0,133950617			
	A	0,183	2,64	62	0,212903226			
	1	0,134	1,94	65	0,149230769			
	3	0,123	1,78	57	0,156140361			
7 hari	S	0,205	2,98	86	0,172093023	0,218 \pm 0,028	0,1135	151
	T	0,143	2,06	52	0,198076923			
	3A	0,180	2,6	54	0,240740741			
	3B	0,182	2,63	54	0,243518519			
14 hari	5	0,192	2,77	60	0,230833333			
	6	0,192	2,77	62	0,223387097			
	N	0,344	4,97	76	0,326973884	0,2618 \pm 0,068	0,02792	151,46
	O	0,213	3,08	64	0,240625			
7 hari	U	0,171	2,47	74	0,166891892			
	V	0,245	3,54	73	0,242465753			
	7A	0,169	2,44	51	0,239215686			
	7B	0,257	3,77	53	0,355660377			
14 hari	J	0,138	1,99	50	0,199	0,24 \pm 0,095	0,0389	150,53
	P	0,163	2,35	63	0,186507937			
	Q	0,140	2,02	54	0,187037037			
	W	0,151	2,18	51	0,21372549			
14 hari	X	0,408	5,89	68	0,433088235			
	14B	0,240	3,47	77	0,225324675			

Lampiran 2. Kadar RNA total jaringan ginjal

	Serapan A260	RNA total µg/mL	Mean±SD	SE
Kontrol	0.029	1,160.00	1590±396	161.9
	0.034	1,360.00		
	0.033	1,320.00		
	0.053	2,120.00		
	0.033	1,320.00		
1 Hari	0.049	1,960.00	2373±489	199.6
	0.050	2,000.00		
	0.067	2,680.00		
	0.050	2,000.00		
	0.085	3,200.00		
	0.059	2,360.00		
3 Hari	0.054	2,160.00	1993± 336	137.6
	0.054	2,160.00		
	0.035	1,400.00		
	0.046	1,840.00		
	0.059	2,360.00		
7 Hari	0.051	2,040.00	1886± 569	232.6
	0.052	2,080.00		
	0.048	1,920.00		
	0.065	2,600.00		
	0.025	1,000.00		
	0.056	2,240.00		
14 Hari	0.037	1,480.00	1620± 602	245.8
	0.062	2,480.00		
	0.021	840.00		
	0.028	1,120.00		
	0.044	1,760.00		
	0.051	2,040.00		

Lampiran 3. Perhitungan metode Pfaffl untuk mencari rasio mRNA HIF-1 α

Kontrol	eff	c(t)	eff	c(t)	Δ Ct Target	Etarget ¹ Δ Ct target	Δ Ct ref	Eref ¹ Δ Ct ref	Rasio
BA KB Ginjal	1.8	23.17	1.34	34.01	28.545	1	23.09866667	1	1
BA KG1 Ginjal	1.58	24.45	1.577	28.545					
BA C4 Ginjal	1.66	24.93	1.47	27.15					
BA KA Ginjal	1.64	21.36	1.65	27.33					
BA C2 Ginjal	1.83	21.49	1.85	25.69					
BA C1 Ginjal	1.6	23.18	1.577	28.545					
BA 1 Ginjal	1.67	23.33	1.53	34.86	1.208833	3.07744	1.841667	4.2985	0.715933465
BA 3 Ginjal	1.71	18.53	1.46	27.3					
BA F Ginjal	1.62	22.51	1.49	26.21					
BA A Ginjal	1.75	22.96	1.6	25.12					
BA D Ginjal	1.76	19.86	1.65	25.31					
BA E Ginjal	1.75	20.34	1.54	25.22					
BA 5 Ginjal	1.76	22.09	1.51	32.26	1.48166	6.809796	2.1433	4.02852	1.690396473
BA 6 Ginjal	1.65	22.48	1.67	30.3					
BA 3A Ginjal	1.8	20.87	1.49	25.56					
BA 3B Ginjal	1.74	21.68	1.91	23.85					
BA S Ginjal	1.78	19.53	1.67	25.94					
BA T Ginjal	1.64	19.07	1.85	24.47					
BA 7A Ginjal	1.79	21.7	1.45	32.74	0.808333	5.754977	1.983333	3.75793	1.531422086
BA 7B Ginjal	1.58	23.03	1.58	34.8					
BA U Ginjal	1.71	21.33	1.64	24.96					
BA V Ginjal	1.59	21.64	1.74	24.17					
BA N Ginjal	1.98	18.99	1.59	25.43					
BA O Ginjal	1.71	19.99	1.83	24.32					
BA X Ginjal	1.64	20.47	1.5	27.31	0.8775	4.104	1.965	3.7547	1.093030069
BA 14B Ginjal	1.62	22.39	1.2	37.45					
BA Q Ginjal	1.58	23.1	1.53	25.87					
BA W Ginjal	1.66	21.31	1.55	23.32					
BA J Ginjal	1.68	19.63	1.59	25.06					
BA P Ginjal	1.77	19.89	1.78	25.6					

Lampiran 4

Rattus norvegicus hypoxia-inducible factor-1 alpha (Hif1a) mRNA

LOCUS AF057308 3718 bp mRNA linear
 ROD 25-APR-2003
 DEFINITION *Rattus norvegicus* hypoxia-inducible factor-1 alpha
 (Hif1a) mRNA,
 complete cds.
 ACCESSION AF057308
 VERSION AF057308.1 GI:4580532
 KEYWORDS .
 SOURCE *Rattus norvegicus* (Norway rat)
 ORGANISM *Rattus norvegicus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires;
 Rodentia;
 Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; *Rattus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3718)
 AUTHORS Zou, A.P., Yang, Z.Z., Li, P.L. and Cowley AW, J.R.
 TITLE Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible
 factor-1alpha in
 renal medullary cells of rats
 JOURNAL *Physiol. Genomics* 6 (3), 159-168 (2001)
 PUBMED 11526200
 REMARK Publication Status: Online-Only
 REFERENCE 2 (bases 1 to 3718)
 AUTHORS Zou, A.P., Su, N., Park, F., Li, P.L. and Cowley, A.W. Jr.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-APR-1998) Departments of Physiology and
 Pharmacology,
 Medical College of Wisconsin, 8701 Watertown Plank
 Road, Milwaukee,
 WI 53226, USA
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3718
 /organism="Rattus norvegicus"
 /mol_type="mRNA"
 /strain="Sprague-Dawley"
 /db_xref="taxon:10116"
 /sex="male"
 /tissue_type="kidney"
 /dev_stage="adult"
 gene 1..3718
 /gene="Hif1a"
 CDS 24..2495
 /gene="Hif1a"
 /note="transcription factor; RH1F-1"
 /codon_start=1
 /product="hypoxia-inducible factor-1 alpha"
 /protein_id="AAD24413.1"
 /db_xref="GI:4580533"

 /translation="MEGAGGENEKKNRMSERRKEKSRDAARRRSKESEVFYELAHQ
 LPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLVRKLLGAGDLIDEMKAQMNCFYLKALDGFVM

VLTDDGDMIIYISDNVNKYMGLTQFELTGHVSFDFTHPCDHEEMREMLTHRNGPVRKGGK
EQNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTSSNQPCGYKKPPM
TCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSMDKFSYCDERITELMGYEPEELLGRSI
YEYHALDSHDLTKTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGGYVWVETQATVIYNTKNSQPQ
CIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTESVLKPVESDMKMTQLFTKVESEDTSCLFDKLK
KEPDALTLAPAAAGDTIISLDFGSDDTETEDQQLEDVPLYNDVMFPSSNEKLNINLAM
SPLPAETPKPLRSSADPALNQEVALKLESSPESLGLSFTMPQIQDQPASPSDGSTRQ
SSPEPNPSEYCFDVS DMVNVFKLELVEKLF AEDTEAKNPFAQDTDL DLEMLAPII
EMDDDFQLRSFDQLSPLESNSPSPSVSTVTGFGQQTQLQKPTITVTATATATDESKA
VTKDNIEDIKILIASPPSTQVPQEMTTAKASAYSGTHSRTASPDRAKRVIEKTDKAH
FRSINLSVTLNQRNTVPEEELNPKTIALONAQRKRKMEHDGSLFQAAGIGTLLQQPGD
RAPTMSLSWKRVKGYISSEQDGMEOKTIFLIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCE
VNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN"

ORIGIN

1 gacaccgagg gcaccgattc gccatggagg gcgcccggcg cgagaacgag
aagaaaaata
61 ggatgagttc cgaacgtcga aaagaaaagt ctagggatgc agcacgatct
cggcgaagca
121 aagagtctga agttttttat gagcttgctc atcagttgcc acttccccac
aacgtgagct
181 cccatcttga taaagcttct gttatgagge tcaccatcag ttacttacgt
gtgaggaaac
241 ttctaggtgc tggatgatctt gacattgaag atgaaatgaa agcacagatg
aactgctttt
301 atctgaaagc cctggatggc tttgttatgg tgctaacaga tgatgggtgac
atgatttaca
361 tttctgataa cgtgaacaaa tacatggggg tgactcagtt tgaactaact
ggacacagtg
421 tgtttgattt taccatcca tgtgaccatg aggaaatgag agaatgctt
acacacagaa
481 atggcccagt gagaagggg aaagaacaaa acacgcagcg aagctttttt
ctcagaatga
541 aatgtaccct aacaagccgg gggaggacga tgaacatcaa gtcagcaacg
tggaaggtgc
601 tgcactgcac aggccacatt catgtgtatg ataccagcag taaccagccg
cagtgtggct
661 acaagaaacc goctatgacg tgettgggtgc tgattttgga acccattcct
catccatcaa
721 acattgaaat tccttttagac agcaagacat ttctcagtcg acacagcctc
gatatgaaat
781 tttcttactg tgatgaaagg attactgagt tgatgggtta tgagccagaa
gaacttttgg
841 gccgttcaat ttatgaatat tatcatgctt tggactctga tcacttgacc
aaaactcatc
901 atgacatggt tactaaagga caagtcacca caggacagta caggatgctt
gcaaaaagag

961 gtggatatgt ctgggttgag actcaagcaa ctggtatata taatacgaag
 aactctcagc
 1021 cacagtgcac tgtgtgtgtg aattatggtg taagtggat tattcagcac
 gacttgattt
 1081 tctcccttca acaaacagaa tctgtcctca aaccagttga atcttcagat
 atgaaaatga
 1141 cccagctggt cactaaagtg gaatctgagg acacgagctg cctcttcgac
 aagcttaaga
 1201 aagagcccga tgcctgact ctgctagctc cagcggctgg ggacacgatc
 atatcactgg
 1261 acttcggcag cgatgacacg gaaactgaag accaacaact tgaagatgtc
 ccgttgta
 1321 atgatgtaat gttccctct tctaatagaga aattaaat aaatctggca
 atgtctccat
 1381 tacctgcctc tgaactcca aagccacttc gaagtagtgc tgatcctgca
 ctgaatcaag
 1441 aggttgcat gaagttagag tcaagcccag agtactggg actttctttt
 accatgcccc
 1501 agattcaaga tcagccagca agtccctctg atggaagcac tagacaaagc
 tcacctgagc
 1561 ctaacagtcc cagtgagtac tgctttgatg tggacagcga tatggtcaat
 gtattcaagt
 1621 tggaaactggg ggaaaaactg tttgctgaag acacagaagc gaagaatcca
 tttcagctc
 1681 aggacactga tttagacttg gaaatgctgg ctccctatat cccaatggat
 gatgattcc
 1741 agttacgttc ctttgatcag ttgtcaccat tagagagcaa ttctccaagc
 cctccgagtg
 1801 tgagcacagt tacaggattc cagcagaccc agttacagaa acctaccatc
 actgtcactg
 1861 ccaccgcaac tgccaccact gatgaatcaa aagcagtgac gaaggacaat
 atagaagaca
 1921 ttaaaatact gattgcatct ccaccttcta cccaagtacc tcaagaaatg
 accactgcta
 1981 aggcacagc atacagtggc actcacagtc ggacagctc accagacaga
 gcaggaaaga
 2041 gagtcataga aaaaacagac aaagctcacc caaggagcct taacctatct
 gtcactttga
 2101 atcaaagaaa tactgttctt gaagaagaat taaacccaaa gacaatagct
 ttgcagaatg
 2161 ctgagaggaa gcgaaaaatg gaacatgatg gctccctttt tcaagcagca
 ggaattggaa
 2221 cgttactgca gcaaccaggt gaccgtgcc ctactatgct gctttcttgg
 aaacgagtga
 2281 aaggatacat atctagtga caggatggaa tggagcagaa gacaattttt
 ttaataccct
 2341 ctgatttagc atgtagactg ctggggcagt caatggatga gagtggatta
 ccacagctga
 2401 ccagttacga ttgtgaagtt aatgctccca tacaaggcag cagaaacctc
 ctgcagggtg
 2461 aagaatact cagagctttg gatcaagtta actgagcttt tccaatctc
 attcctttga
 2521 ttgttaattt ttgtgttcag ttgttgggtg tgtctgtggg gtttcgtttc
 tgttggtgt
 2581 tttggacact ggtggctcag cagtctatct atattttcta tatctcattt
 agaggcctgg
 2641 ctacagtact gcaccaactc agatagttta gtttgggcc cttctctctt
 cattttcact

2701 gatgctcttt ttaccatgtc cttogaatgc cagatcacag cacattcaca
gctccccagc
2761 atttcaccaa tgcattgctg tagtgctggt taaaatgcac ctttttattt
atttattttt
2821 ggtgagggag tttgtccctt attgaattat ttttaatgaa atgccaatat
aattttttaa
2881 gaaggcagta aatcttcacg atgatgatag gcagttgaaa attttttact
catttttttc
2941 atgttttaca tgaaaataat gctttgccag cagtacatgg tagccacaat
tgcacaatat
3001 atttttctaa aaataccagc agttactcat gcatatattc tgcatttata
aaactagttt
3061 ttaagaagaa actttttttg gcttatggaa ttgttaagcc tggatcatga
tgctggtgat
3121 cttataatga ttcttaaact gtatggtttc tttatatggg taaagccatt
tacctgatat
3181 agagagatat gcttatatct ggaaggata tggcatttat ttggataaaa
ttctcaattg
3241 agaagttatc tgggtgttct ttactttacc ggcacaaaag aaaacagtcc
ctatgtagtt
3301 gtggaagctt atgctaatat tgtgtaattg atattaaaca ttaaagtgtc
tgcctatcct
3361 gttggataaa agacattttg agcatactgt aaacaaaaaa atcatgcatt
gttagtaaaa
3421 ttgcctagta tgttaatttg ttgaaaatac gatgtttggg tttatgcact
ttgtcgtat
3481 taacatcctt tttttcatat agatttcaat aattgagtaa ttttagaagc
attattttag
3541 aaatatagag ttgtcatagt aaacatcttg ttttttttc tttttttcta
tgtacattgt
3601 ataaattttt cattcccttg ctctttgtag ttgggtctaa cactaactgt
actgttttgt
3661 tatatcaaat aaacatcttc tgtggaccag gaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaa
//

Analisis statistik normalitas kadar protein

Tests of Normality

khip	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kdrprot 1	.188	6	.200*	.970	6	.890
2	.211	6	.200*	.926	6	.549
3	.242	6	.200*	.887	6	.302
4	.279	6	.159	.913	6	.458
5	.398	6	.004	.639	6	.001

a. Lilliefors Significance Correction

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

Analisis statistik Uji Kemaknaan dengan metode Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	KDRPROT
Chi-Square	8.323
df	4
Asymp. Sig.	.080

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
KLPHIP

Analisis Korelasi mRNA HIF-1 α dan hasil *Western Blot* HIF-1 α

Correlations

		mRNA	WB
Spearman's rho	mRNA	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.800
		N	.104
WB	WB	Correlation Coefficient	.800
		Sig. (2-tailed)	1.000
		N	.104
		N	5
			5

Analisis Korelasi mRNA HIF-1 α dengan pO₂

Correlations

			mRNA	pO ₂
Spearman's rho	mRNA	Correlation Coefficient	1.000	-.500
		Sig. (2-tailed)	.	.391
		N	5	5
	pO ₂	Correlation Coefficient	-.500	1.000
		Sig. (2-tailed)	.391	.
		N	5	5

Analisis Korelasi protein HIF-1 α dengan pO₂

Correlations

			pO ₂	WB
Spearman's rho	pO ₂	Correlation Coefficient	1.000	-.700
		Sig. (2-tailed)	.	.188
		N	5	5
	WB	Correlation Coefficient	-.700	1.000
		Sig. (2-tailed)	.188	.
		N	5	5

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Yulia Suciati
NPM : 0706170772
Tempat/Tanggal Lahir : Bekasi, 2 Januari 1977
Agama : Islam
Alamat : Jl. Lapangan Kobra Rt 05/ 02
 No 108 A Tambun Selatan Bekasi
Pekerjaan : Staff Pengajar Biokimia
 FK Universitas YARSI
Alamat : Jl. Letjen Suprpto Cempaka Putih Jakarta Pusat
Riwayat pendidikan :
 1995- 1999 :S1 Fakultas Kedokteran Universitas YARSI
 1999- 2002 : Profesi Dokter FK Universitas YARSI
 2007- 2009 : S2 Program Studi Ilmu Biomedik FKUI
Riwayat Pekerjaan :
 2003- Sekarang : Staff Pengajar Biokimia FK Universitas YARSI
Sumber dana penelitian : DRPM UI dan Universitas YARSI



POLA mRNA *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 α* (HIF-1 α) DAN EKSPRESI PROTEIN HIF-1 α GINJAL TIKUS PADA HIPOKSIA SISTEMIK KRONIK

Yulia Suciati*, Ani Retno Prijanti**, Mohamad Sadikin**

* Mahasiswa Magister Biomedik FKUI

** Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI

ABSTRAK

Keadaan hipoksia dapat membuat sel melakukan adaptasi melalui ekspresi berbagai macam gen. Banyak gen tersebut adalah gen yang diinduksi oleh suatu faktor transkripsi yang disebut HIF-1. HIF-1 α adalah subunit yang diregulasi oleh kadar oksigen untuk aktifitas faktor transkripsi tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana pola mRNA HIF-1 α dan ekspresi protein HIF-1 α pada organ ginjal dari tikus yang mengalami kondisi hipoksia secara sistemik yang terbagi menjadi 5 kelompok berdasarkan lamanya perlakuan (kelompok kontrol, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari masing-masing 6 ekor tikus per kelompok) menggunakan *Hypoxic Chamber* dengan kadar O₂ 8% dan Nitrogen 92%. Pola mRNA HIF-1 α dilihat berdasarkan hasil RT-PCR dengan membandingkan rasio kelompok normoksia dan kelompok hipoksia. Ekspresi protein HIF-1 α dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan menggunakan anti HIF-1 α sebagai antibodi primer.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α sejalan dengan lamanya hipoksia yang mencapai puncak pada kelompok hipoksia 3 hari dan mulai mengalami penurunan pada kelompok 7 hari. Sementara protein HIF-1 α memperlihatkan terdapatnya peningkatan ekspresi protein HIF-1 α yang mulai mengalami penurunan pada kelompok hipoksia 14 hari. Dapat disimpulkan bahwa terjadi regulasi HIF-1 α terjadi pada tahap transkripsi dan tahap pasca translasi.

Kata kunci :
Hipoksia, ekspresi gen HIF-1 α , Ginjal

ABSTRACT

Hypoxia could make cell to adapt through gene expression. Many of these gene induced by the transcription factor called HIF-1. HIF-1 α is the subunit which regulated by oxygen level to activated the transcription factor.

The aim of this study is to know the pattern of *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) mRNA and HIF-1 α protein Expression of Renal Rat in Systemic Chronic Hypoxia which divided to 5 groups based on the duration of hypoxia (control, 1, 3, 7, and 14 days of hypoxia with 6 rats each group) using hypoxic chamber with 8% oxygen and 92% Nitrogen. The pattern was measure with RT-PCR which combine the ratio of control group and the hypoxic group. The protein expression measure with Western Blot method using anti HIF-1 α as 1st antibody.

The result shows that HIF-1 α mRNA elevated gradually and reach a peak at 3 days of hypoxia and start to decrease since then. While the HIF-1 α protein shows an increase expression until 14 days of hypoxia which start to decrease. It can be concluded that HIF-1 α regulation occurs in transcription level and post translation.

Key Words:
Hypoxia, HIF-1 α gene expression, Ren

Pendahuluan

Oksigen memegang peranan penting dalam kehidupan terutama pada organisme aerob, yang menggunakan oksigen yang berperan sebagai akseptor elektron terakhir pada rantai pernafasan dalam rangka memperoleh energi maksimal⁽¹⁾. Sel memiliki respon terhadap

perubahan ketersediaan oksigen yang berdampak pada banyak aspek homeostasis baik secara fisiologis maupun patologis⁽²⁾. Sebagai respon terhadap hipoksia, terdapat perubahan ekspresi banyak gen yang ternyata diperantarai oleh suatu faktor transkripsi yang dinamakan *Hypoxia Inducible Transcription Factor (HIF)*⁽¹⁻⁴⁾.

HIF diaktivasi secara fisiologis oleh hipoksia⁽¹⁻⁴⁾. Kedua mRNA subunit HIF (α dan β) dan proteinnya selalu diekspresi, namun subunit HIF 1α secara cepat langsung didegradasi pada kondisi normoksia⁽¹⁻²⁾. HIF ternyata juga mempunyai peran penting dalam regulasi proses biologis baik pada kondisi fisiologis maupun patologis ginjal.

Ginjal adalah organ yang sangat sensitif terhadap perubahan pasokan oksigen. Sensitivitas ini memiliki keuntungan salah satunya dengan cara memfasilitasi ginjal untuk memproduksi eritropoetin dalam mekanisme adaptasinya. Regulasi produksi eritropoetin diinduksi oleh HIF 1α . Namun, tingginya sensitivitas terhadap tekanan oksigen ini juga dapat mengakibatkan kecenderungan ginjal terhadap terjadinya kerusakan sel yang disebabkan hipoksia (*hypoxic injury*).

Secara khusus, HIF berperan dalam regulasi angiogenesis, metabolisme energi, apoptosis dan metabolisme besi, regulasi pH dan regulasi vasomotor. Hipoksia memegang peranan penting dalam perkembangan kerusakan ginjal akut, nefropati radiokontras, dan glomerulonefritis akut. Banyak data menunjukkan hipoksia kronik adalah jalur utama dari stadium akhir gagal ginjal kronik⁽⁸⁾.

Melihat bahwa hipoksia pada ginjal mempunyai peran penting dalam perkembangan dan progresivitas baik gagal ginjal akut maupun kronis, maka aktivasi HIF dapat menjadi sasaran utama terapi dalam pendekatan terapi di masa depan yang dapat dipertimbangkan untuk gagal ginjal, dimana aktivasi HIF dapat menimbulkan ekspresi berbagai macam

gen yang bertujuan untuk mekanisme adaptasi terhadap kondisi hipoksia pada ginjal^(2,8).

Metode penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo*. Penelitian ini menggunakan tikus Sprague Dawley. Jantan yang sehat, umur 10-12 minggu dengan berat badan 150-200 gr, yang diperoleh dari Laboratorium LKM Depkes RI Jakarta. Binatang coba pada percobaan ini dilakukan induksi hipoksia dan kontrol normoksia yang dibagi menjadi enam kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol atau tanpa perlakuan dan lima kelompok lainnya adalah kelompok perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia 1, 3, 5, 7, dan 14 hari. Gas campuran khusus dalam tangki gas yang digunakan mengandung oksigen 8 % dan nitrogen 92% dengan sungkup hipoksia (*Plexyglass Hypoxic Chamber*).

Isolasi RNA

Sebanyak 50-100 mg jaringan hati dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu ditambahi 1 mL TriPure Isolation Reagent dan dihomogenisasi. Setelah itu homogenat diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25°C. Setelah diinkubasi homogenat ditambahkan 0,2 ml CHCl_3 dan dikocok kuat selama 15 detik. Inkubasi diulangi 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 tiga fase: fase air tidak berwarna dibagian atas mengandung RNA, sedangkan interfase dan fase organik berwarna merah dibagian bawah mengandung DNA dan protein.

Isolasi DNA

Karena DNA dan protein tercampur pada interfase dan fase organik, maka keduanya harus dipisahkan dengan mengendapkan DNA. DNA diendapkan dengan menambahkan 0,3 mL EtOH 75%, kemudian dicampur rata dengan membolak-balik tabung. Inkubasi diulangi lagi 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 lalu dapat disimpan pada suhu 2-8 °C.

Isolasi Protein

Protein dipisahkan dari fenol dan EtOH dengan cara presipitasi. Sebanyak 1,5 mL isopropanol ditambahkan ke supernatan fenol-EtOH dan tabung dibalik-balik beberapa kali, kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25 °C untuk mengendapkan 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 diresuspendi dengan 2 mL 0,3 M guanidin HCl dalam EtOH 95%. 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.

Endapan protein yang telah dicuci 3 kali kemudian ditambahi 2 mL EtOH 100% lalu divorteks. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25 °C dan disentrifugasi 7500 g selama 5 menit pada suhu 2-8 °C. Supernatan dibuang, sedangkan kelebihan EtOH dibuang dengan pengering udara. Endapan protein dilarutkan dengan menambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 1% dalam aquadest dan memipet beberapa kali. Endapan 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 panjang gelombang 280 nm dan membandingkannya terhadap standar.

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan SDS-PAGE sesuai metode Laemmli. Dengan akrilamid/bisakrilamid (30:1), 6,8 mL Tris HCl 1,5 M pH 8,6, 10,4 mL aquabides, 296 uL SDS 10%, 200 uL APS

10% dan 20 uL TEMED. Volume sample disesuaikan sehingga total mengandung protein sebanyak 50 ug. Sampel dicampur dengan dapar sampel dan β-merkaptotanol. Perbandingan dapar sampel dengan β-merkaptotanol adalah 19:1. Sampel divorteks dan disentrifugasi secukupnya lalu dipanaskan pada suhu 95-100°C selama 3-5 menit. Elektroforesis dijalankan selama 3 jam 30 menit pada 90 Volt.

Western Blot

Blotting (BioRad) menggunakan alat SemiDry Trans Blot (BioRad) selama 2 jam ,400mA. *Blocking* dengan larutan susu skim 10%. 1st Antibodi primer (Anti HIF-1α, Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:500). Antibody sekunder menggunakan anti IgG *Mouse* berlabel peroksidase (Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:1000). Reaksi enzimatik ini terdiri dari 2,5 ml aseton, 25 uL larutan H₂O₂ 30%, 3-Aminoethyl-Carbazole (Sigma Aldrich) dan buffer asetat 0,5 M pH 5,0.

Real Time PCR untuk penetapan kadar mRNA HIF-1α dengan *iScript One Step RT-PCR with SYBR Green*.

Pada *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), untai RNA akan mengalami *reverse transcription* lebih dahulu menjadi *complementary DNA* (cDNA) dengan enzim *reverse transcriptase*, selanjutnya cDNA akan mengalami amplifikasi seperti prinsip PCR konvensional. Reaksi RT-PCR haruslah sensitive dan spesifik dan menghasilkan hasil amplifikasi yang baik. Untuk itu maka harus diperhatikan adalah mengetahui suhu *annealing* yang optimal dan membuat kurva standar untuk mengevaluasi hasil pemeriksaan.

Protokol reaksi:

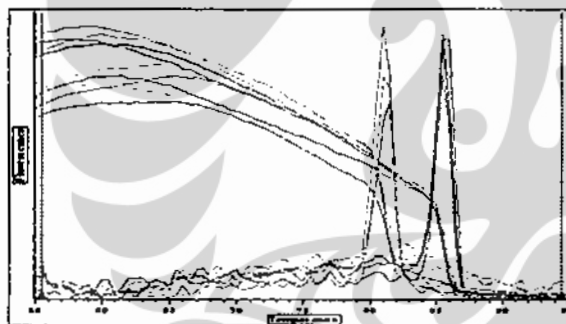
Incubasi campuran komponen dalam system deteksi thermal real time miniOpticon (BioRad) sebagai berikut:

Sintesis cDNA 10 menit pada 50°C
 Inaktivasi Iscript Reverse Transcriptase
 5 menit pada 95 °C
 Siklus PCR dan deteksi
 10 detik pada 95°C
 30 detik pada 60 °C
 30 detik pada 72°C
 (Pengumpulan data)

Melt Curve analysis

1 menit pada 95 °C
 1 menit pada 55 °C
 10 detik pada 55-95 °C

Sebelum *running* RT-PCR mRNA HIF-1α dijalankan, terlebih dahulu dilakukan optimalisasi dengan mencari suhu *annealing* dan melihat *melting curve* menggunakan primer HIF-1α dan primer β aktin. Primer HIF-1α memiliki Tm 58°C dan Tm untuk primer β aktin adalah 62°C. setelah dilakukan optimalisasi, maka pada suhu 60°C RT-PCR akan dijalankan. Primer yang digunakan menunjukkan kespesifikan dengan melihat hasil *melting curve* keduanya yang menunjukkan satu puncak sehingga cukup layak digunakan.



Gambar 1. *Melting curve* beta aktin dan HIF

Analisis hasil RT-PCR harus dilakukan normalisasi agar data dapat bermakna secara biologis. Normalisasi pada metode kuantifikasi relative dapat menggunakan gen referen. Gen referen adalah gen yang level ekspresinya konstan disemua sample tes, dan dimana ekspresinya tidak dipengaruhi oleh perlakuan saat penelitian.

Hasil dan Pembahasan

Ginjal merupakan organ yang secara fisiologis berada pada kondisi hipoksia. Tekanan oksigen ginjal berkisar antara 10-30 mmHg. Hal ini disebabkan struktur anatomis vaskularisasi ginjal yang memungkinkan terjadinya difusi oksigen antara pembuluh darahnya.^{2,12-16}

Dari penelitian Ferdinal et al yang menggunakan objek penelitian yang sama, didapatkan hasil analisis gas darah yang diambil dari aorta saat dilakukan pembedahan. Terlihat adanya penurunan parameter yang mengindikasikan telah terjadinya hipoksia dengan melihat penurunan tekanan parsial O₂, pCO₂, dan saturasi oksigen yang sejalan dengan lamanya hipoksia.

Tabel 1. Hasil analisis gas darah dan berat hewan coba

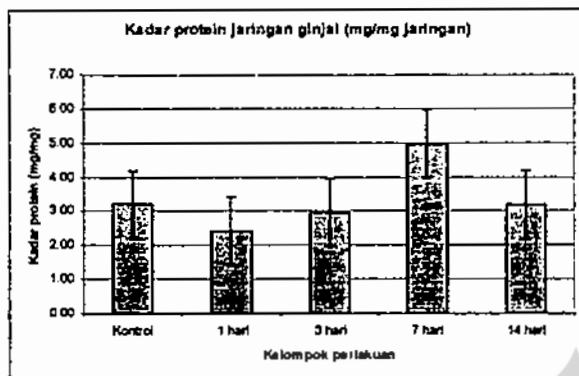
Parameter	normoksia	hipoksia			
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari
pO ₂ arteri, mmHg	96.4± 4.8	56.2 ± 6	51 ± 5.2	44.6 ± 4	35.6 ± 3.1
pCO ₂ arteri, mmHg	40.4 ± 2.7	36.2 ± 2.2	33.3 ± 2.2	29 ± 3.3	23.7 ± 2.4
saturasi O ₂ arteri, %	94.1± 3.1	65.2 ± 6.2	60.2 ± 5.5	57.3 ± 5.4	52.9 ± 8.6
pH	7.39± 0.01	7.4 ± 0.01	7.4 ± 0.01	7.4 ± 0.02	7.37 ± 0.01
BB akhir, g	178	175	209	206	210
Berat rata-rata ginjal, mg	612	617	745	754	767
Rasio BG/BB (mg/g)	3.43	3.52	3.56	3.66	3.65

Tabel analisis gas darah dikutip dari penelitian Ferdinal et al dari proyek hipoksia yang sama.

Kadar protein jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.

Hipoksia adalah suatu kondisi yang akan mempengaruhi sel-sel ginjal dalam kelangsungan hidupnya. Untuk itu sel harus dapat bertahan dengan melakukan mekanisme adaptasi atau bila hal tersebut sudah tidak mampu dikendalikan maka akan terjadi kematian sel.

Adaptasi sel terhadap kondisi hipoksia ini dapat terlihat dari perubahan protein pada masing- masing kelompok seperti terlihat pada gambar berikut:



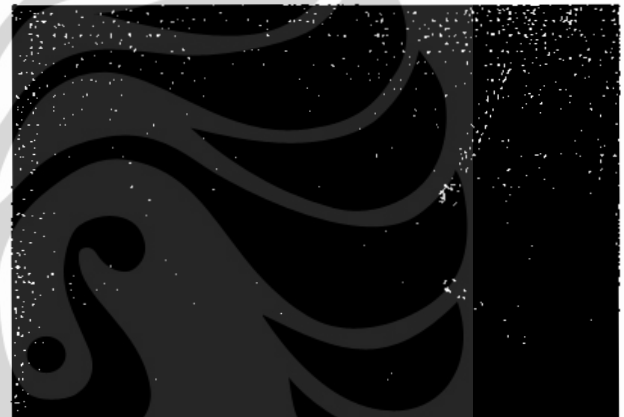
Gambar 2. Diagram batang kadar protein jaringan ginjal pada kelompok normoksia, hipoksia 1,3,7 dan 14 hari. $p > 0.05$

Secara statistik, tes normalitas dengan Uji Kolmogorov Smirnov menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal, Analisis lalu dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan metode Kruskal Wallis yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar protein antar kelompok ($p > 0.05$). Namun bila dilihat gambar 4.2. dapat terlihat perbedaan yang cukup signifikan antara kelompok perlakuan.

Berdasarkan grafik kadar protein (gambar 2.), terlihat peningkatan kadar protein seiring dengan lamanya hipoksia. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena adanya proses adaptasi sel ginjal terhadap kondisi hipoksia. Pada hipoksia satu hari, terlihat sedikit penurunan kadar protein dibandingkan kontrol, yang mungkin disebabkan oleh respon awal sel terhadap hipoksia dimana terjadi penurunan metabolisme dan penghematan energi yang ada. Namun seiring dengan lamanya hipoksia, akan terjadi adaptasi sel diantaranya melalui penurunan katabolisme protein, pemanjangan waktu paruh protein, dan terstabilisasinya HIF-1 α sebagai master gen yang mengatur ± 100 gen untuk proses adaptasi terhadap hipoksia.

Hal ini terlihat pada hasil Western Blot protein HIF-1 α (Gambar 3). Pada gambar yang diambil menggunakan kamera digital ini, terlihat ekspresi protein HIF-1 α yang ditandai dengan pita berwarna kecoklatan. Pada kelompok kontrol (K), sudah dapat terlihat pita kecoklatan yang

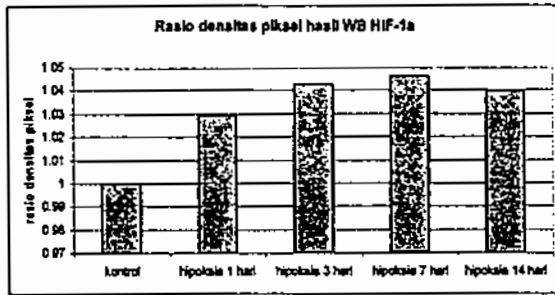
lebih tipis bila dibandingkan dengan pita-pita dari kelompok hipoksia. Hal ini memang dapat terjadi disebabkan memang dalam kondisi fisiologis ginjal merupakan organ yang relatif hipoksia, sehingga terdapat ekspresi protein HIF-1 α dalam jumlah yang kecil. Pada kelompok hipoksia, terlihat pita semakin tebal yang menandakan semakin meningkatnya jumlah protein HIF-1 α yang memang mengalami stabilisasi pada kondisi hipoksia 1,3,dan 7 hari, namun pada kondisi hipoksia lebih lanjut, yaitu pada 14 hari, stabilisasi HIF-1 α sudah tidak sejelas kelompok hipoksia sebelumnya yang mungkin disebabkan karena jumlahnya yang mulai sedikit karena sudah ada yang mengalami degradasi oleh kompleks proteasom.



Gambar 3. Hasil foto Western Blot protein HIF 1 α ginjal tikus kelompok kontrol dan kelompok hipoksia sistemik

HIF-1 α memiliki berat molekul 120 kDa, namun pada hasil Western blot ini terdapat dua pita (tanda panah) yaitu pada berat molekul 66.200 Da dan 45.000 Da, yang mungkin disebabkan telah terpecahnya molekul protein HIF-1 α karena masih terdapatnya protease sel dalam sampel.

Pada perhitungan rasio densitas rata-rata piksel menggunakan software Adobe Photoshop CS2, didapatkan hasil seperti gambar berikut:



Gambar 4. Diagram baris hasil pengukuran densitas pada foto Western Blott HIF-1 α

Stabilisasi HIF-1 α disebabkan oleh tidak aktifnya enzim prolin hidroksilase yang membutuhkan oksigen sebagai salah satu substratnya. Ketidakaktifan enzim prolin hidroksilase akan menyebabkan HIF-1 α tidak mengalami hidroksilasi pada residu prolin sehingga tidak dapat dikenali oleh pVHL dan berakibat tidak dapat didegradasi oleh kompleks proteasom. HIF-1 α akan berdimer dengan HIF-1 β membentuk HIF-1 yang merupakan faktor transkripsi bagi banyak gen yang mengatur respon adaptif terhadap hipoksia. Stabilisasi HIF-1 α ini akan terus berlangsung sepanjang sel tersebut mampu untuk mempertahankan diri pada kondisi hipoksia. Bila sel tersebut sudah tidak mampu lagi mempertahankan respon adaptif tadi, maka sel tersebut akan mengalami apoptosis.

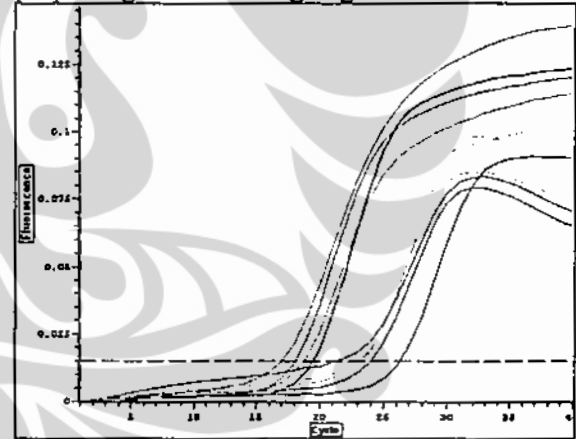
Kadar RNA Total

Hasil serapan total RNA sampel yang berhasil diisolasi diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm agar dapat ditentukan konsentrasi RNA total masing-masing sampel. Kadar RNA total ini digunakan untuk menyamakan jumlah RNA yang akan digunakan pada RT-PCR kurang lebih sama yaitu 500 ug tiap sampel dengan cara mengatur volume dan pengenceran RNA total yang digunakan pada tiap campuran RT-PCR. Kadar RNA total dan hasil serapannya dapat dilihat pada lampiran dua.

Rasio mRNA HIF-1 α jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari.

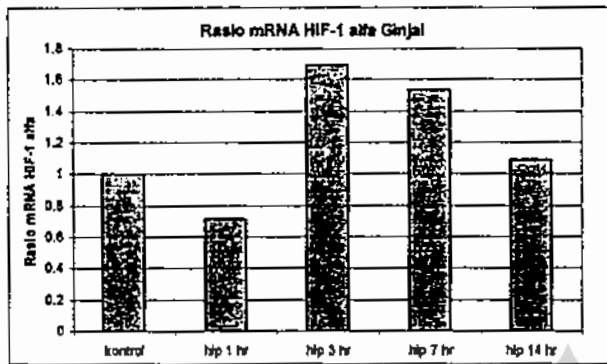
Langkah selanjutnya adalah running RT-PCR yang diikuti dengan analisis hasil RT-PCR. Metode analisis RT-PCR yang digunakan pada percobaan ini adalah relative kuantitatif, yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel yang normal dibandingkan dengan sel yang mengalami perlakuan. Melalui metode ini dapat ditentukan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel target meningkat atau menurun dibandingkan dengan sel normal (kontrol).

Dari hasil running RT-PCR yang didapatkan, terlihat nilai efisiensi yang sangat bervariasi, maka tingkat ekspresi relative mRNA HIF-1 α ditentukan berdasarkan rumus Pfaffl.²² Selain nilai efisiensi, terdapat nilai lain yang diperlukan dalam analisis hasil RT-PCR, yaitu C(t). Nilai C(t) ditentukan oleh alat Real Time PCR secara otomatis berdasarkan perpotongan kurva dengan garis threshold.



Gambar 5. C(t) β -aktin dan HIF-1 α

Analisis data RT-PCR mRNA HIF-1 α menggunakan metode Pfaffl yang didasari atas ketidakseragaman efisiensi amplifikasi antara gen target (HIF-1 α) dan gen referen (β -aktin).²² Hasil perhitungan rasio mRNA HIF-1 α menggunakan metode Pfaffl. Dari hasil yang didapat, terlihat adanya peningkatan rasio ekspresi mRNA HIF-1 α yang terlihat pada gambar berikut:



Gambar 6. Diagram batang rasio mRNA HIF-1 α pada kelompok normoksia, hipoksia 1,3,7 dan 14 hari.

Pada gambar 6, sudah terdapat ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok kontrol. Hal ini disebabkan bahwa pada kondisi fisiologis ginjal memang relatif berada dalam kondisi hipoksia. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya respon awal sel melalui penurunan metabolisme dan energi. Peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α terjadi sebanyak 1,6 kali lipat dibanding kontrol pada kelompok hipoksia 3 hari, 1,5 kali lipat pada 7 hari dan 1,09 pada hipoksia 14 hari.

Hasil analisis data dengan menggunakan metode Kruskal wallis menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rasio ekspresi mRNA HIF-1 α sejalan dengan lamanya hipoksia hingga hari ke 7 diikuti dengan penurunan rasio ekspresi mRNA pada hipoksia 14 hari (Gambar 6). Namun secara statistik peningkatan rasio mRNA HIF-1 α ini tidak bermakna ($p > 0.05$).

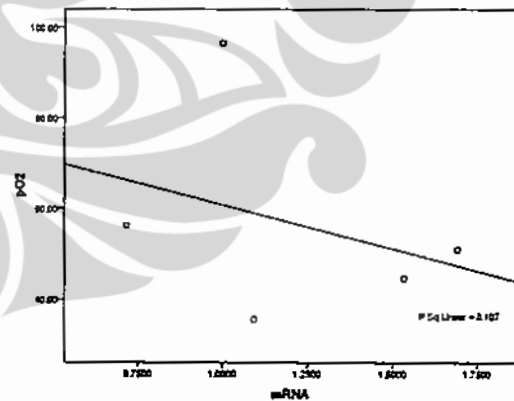
Terdapatnya ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok kontrol (normoksia), dapat disebabkan oleh karena kondisi fisiologis jaringan ginjal yang relatif hipoksia, hal ini juga dapat terlihat pada penelitian Heidbreder et al, 2003 yang memberikan hasil yang sama dimana terdapatnya ekspresi mRNA HIF-1 α pada kelompok normoksia ginjal.²⁷ Kondisi awal hipoksia terlihat sel sedang mengalami adaptasi sehingga ekspresi mRNA HIF-1 α terjadi peningkatan. Peningkatan rasio ekspresi mRNA dapat disebabkan karena adanya respon adaptasi sel untuk tetap bertahan pada kondisi hipoksia. Respon adaptif ini dimotori oleh HIF-1 α karena protein ini memang merupakan suatu master

gen yang mengatur banyak gen dalam kondisi hipoksia, diantaranya gen untuk eritopoesis, angiogenesis, metabolisme an aerob karbohidrat, proliferasi sel dan apoptosis.¹¹

Pada kondisi hipoksia 7 dan 14 hari mulai terjadi penurunan ekspresi HIF-1 α bila dibandingkan kelompok hipoksia 1 dan 3 hari namun tetap lebih tinggi bila dibandingkan kontrol. Penurunan ekspresi ini dapat disebabkan oleh mulai adanya penekanan ekspresi mRNA HIF-1 α oleh protein HIF-1 α yang sudah banyak terstabilisasi atau karena sel sudah mulai kehilangan daya adaptasinya terhadap hipoksia.²⁸

Hubungan antara mRNA, protein HIF-1 α dan pO₂

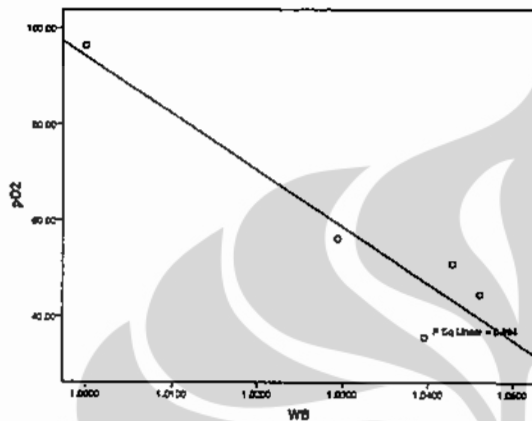
Untuk dapat melihat apakah terdapat hubungan korelasi antara hipoksia dengan kadar mRNA HIF-1 α , dilakukan analisis korelasi menggunakan metode Spearman's Rho. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif sedang ($R = -0.5$, $p > 0.05$) yang menggambarkan bahwa semakin rendah pO₂, semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 α dan tidak terdapat hubungan bermakna antar kadar pO₂ dan mRNA HIF-1 α (Gambar 7).



Gambar 7. Diagram Scatter untuk korelasi pO₂ dengan mRNA HIF-1 α ginjal

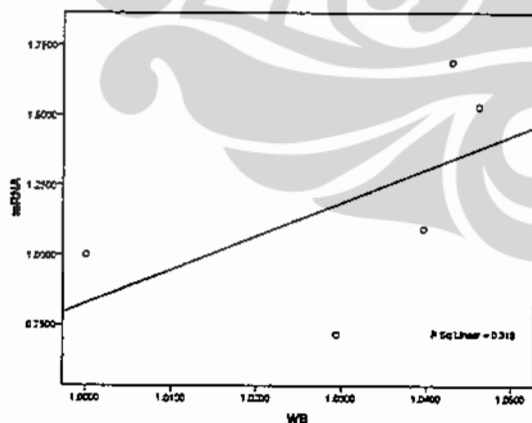
Sementara untuk korelasi pO₂ dengan hasil *Western Blot* dengan uji korelasi Spearman's Rho (Gambar 8), terdapat korelasi negatif yang kuat dan terdapat perbedaan bermakna

antar kadar saturasi O_2 dan hasil *Western Blot* ($R=-0.7$, $p>0.05$). Analisis ini menggambarkan bahwa semakin rendah kadar tekanan parsial O_2 , semakin tinggi ekspresi HIF-1 α yang tergambar dari nilai densitasnya dan tidak terdapat hubungan bermakna antara kadar saturasi O_2 dan hasil *Western Blot* HIF-1 α .



Gambar 8. Diagram *scatter* untuk korelasi pO_2 dengan hasil *Western Blot* HIF-1 α ginjal

Untuk korelasi antara hasil *Western Blot* dengan rasio mRNA, juga dilakukan analisis dengan korelasi Spearman's Rho yang menunjukkan hasil adanya korelasi sangat kuat ($R=0.8$) dan $p>0.05$. Korelasi bernilai positif yang menunjukkan bahwa semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 α , semakin tinggi nilai densitas hasil *Western Blot* HIF-1 α namun tidak terdapat hubungan bermakna antar keduanya (Gambar 4.10.)



Gambar 9. Diagram *scatter* untuk korelasi mRNA dan Hasil *Western Blot* HIF-1 α ginjal.

Oksigenisasi pada parenkim ginjal menggambarkan adanya keseimbangan antara pasokan oksigen dan konsumsinya, terutama untuk transport di tubulus. Kebutuhan O_2 diatur oleh Laju Filtrasi Glomerulus/*Glomerular Filtration Rate* (GFR), jumlah pompa ion, dan berbagai macam regulator yang mengatur aktifitas transport.³¹

Secara fisiologis, ginjal adalah organ yang hipoksia dan memiliki rasio konsumsi berbanding pasokan yang terendah dibandingkan dengan organ lain.³²

Terdapatnya gradien ketersediaan O_2 memang dibutuhkan ginjal untuk menjalankan berbagai macam fungsi fisiologisnya. Hal ini menjelaskan bahwa pada kelompok kontrol (normoksia) penelitian ini memang terdapat ekspresi mRNA HIF-1 α dan protein HIF-1 α yang merupakan protein yang terekspresi pada kondisi hipoksia. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Stroka et al, 2001 yang menyatakan bahwa protein HIF-1 α terdapat pada kondisi normoksia di jaringan otak, ginjal, hati dan jantung dengan metode imunohistokimia.³⁷ Tekanan oksigen fisiologis pada jaringan yang mungkin menyebabkan protein HIF-1 tetap ada dalam jumlah kecil untuk mempertahankan homeostasis jaringan.³⁷ Diduga bahwa HIF-1 yang berada pada kondisi normoksia jaringan berfungsi untuk mempertahankan ekspresi gen pada tingkat basal dalam rangka pemenuhan energi sel. Selain itu ekspresi HIF tidak hanya menggambarkan kondisi patologis.. Penelitian Haase et al, 2006, mengemukakan bahwa hipoksia terjadi selama embriogenesis normal dalam kondisi fisiologis.

Penelitian ini memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α sejalan dengan lamanya hipoksia yang juga diikuti oleh peningkatan kadar protein HIF-1 α yang mengalami stabilisasi selama sel masih dapat bertahan untuk hidup.

Pada kondisi hipoksia kronis, stabilisasi HIF juga dilaporkan oleh Manotham et al, 2005 dengan metode imunohistokimia yang mendeteksi adanya HIF-1 α pada medulla ginjal.³³ Lidgren et al, 2008 melaporkan adanya peningkatan

ekspresi mRNA HIF-1 α pada pasien *Renal Clear Carcinoma* yang juga mengalami hipoksia jaringan.

Adanya penurunan ekspresi mRNA HIF-1 α juga dilaporkan oleh Belaiba et al, 2007 yang melaporkan bahwa pada model hipoksia 10% O₂ pada paru tikus didapatkan peningkatan mRNA HIF-1 α hingga hipoksia 1 jam yang diikuti dengan penurunan mRNA HIF-1 α , namun ekspresi protein semakin meningkat hingga hipoksia 16 jam.³⁴ Lidgren et al, 2008 juga melaporkan hal yang sama pada ekspresi mRNA HIF-1 α pasien *Renal Clear Carcinoma*. Hal ini dapat disebabkan oleh karena adanya up-regulasi protein HIF-1 α , yaitu adanya akumulasi faktor transkripsi dan akhirnya dapat menekan ekspresi mRNA HIF-1 α pada tingkat tertentu.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme adaptasi hipoksia yang tergantung HIF-1 α bukan hanya disebabkan oleh peningkatan stabilitas protein HIF-1 α namun juga sebagai akibat dari peningkatan mRNA HIF-1 α atau terjadi regulasi pada tingkat transkripsi dan pascatranslasi.²⁶

Terjadinya penurunan ekspresi HIF-1 α dapat disebabkan oleh adanya ketidakmampuan sel dalam melakukan adaptasi terhadap hipoksia sehingga sel akan mengalami apoptosis atau nekrosis. Banyak sekali mediator untuk terjadinya apoptosis termasuk juga perubahan pH intrasel, radikal bebas, dan deplesi energi (ATP). Dagher PC et al, 2004, mengemukakan bahwa deplesi energi dan aktivasi p53 adalah pencetus utama kematian sel terprogram.³⁸ Selain itu, Saikumar et al, 2003, menyatakan bahwa pada sel ginjal yang mengalami hipoksia, Bax dan Bak, 2 protein *pro-apoptotic* dari *Bcl-2 family*, bekerja sama untuk membuat membran luar mitokondria menjadi permeabel terhadap protein Cyt c. Selanjutnya Cyt c akan merangsang kaskade apoptosis.³⁹ Pada kondisi ini, HIF-1 α akan diikat oleh MDM2 dan didegradasi oleh proteasom 26S tanpa melibatkan pVHL.²⁶

Hipoksia pada ginjal mengarah pada efek yang diinginkan maupun yang tidak diinginkan yang akhirnya pada banyak kasus

mengarah pada terjadinya progresifitas gagal ginjal kronis. Heymen et al, 2008 mengemukakan terdapatnya dua faktor utama yaitu hipoksia dan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mengalami induksi dalam kondisi hipoksia. Hal ini menginisiasi faktor transkripsi baik HIF maupun non-HIF, serta efektor host yang digolongkan sebagai mediator berbahaya dan mediator pelindung yang berperan dalam hasil akhir kondisi ginjal. Mereka berperan dalam sejumlah proses patofisiologis dalam partisipasinya pada progresifitas Gagal Ginjal Kronis. Diantara mediator yang berbahaya adalah poros Renin-Angiotensin-Aldosteron, endotelin, *plasminogen activator-inhibitor I*, molekul adhesi, dan *Growth Factor* yang dengan adanya hipoksia memicu terjadinya disfungsi endotel, vasokonstriksi, deplesi mikrovaskular, inflamasi, fibrosis dan kerusakan tubulus dan glomerulus. Berlawanan dengan hal itu, hipoksia juga dapat memicu efek proteksi, seperti eritropoiesis dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), yang dengan cara tertentu menangkis efek berbahaya dengan cara angiogenesis, perbaikan oksigenasi jaringan dan daya hidup sel, serta memfasilitasi *homing* dari sel-sel progenitor. Akhirnya, mediator mana yang menentukan tergantung dari besarnya intensitas ekspresi dan kerja mediator tersebut.^{12,14-15, 31, 35-36}

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. dr. M. Sadikin, Dsc dan dr. Ani Retno Prijanti, MS atas keikutsertaan penulis dalam proyek hipoksia yang diberikan, dan terima kasih kepada DRPM UI dan Universitas YARSI atas dana penelitian dan beasiswa yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bruick, R. K. Oxygen sensing in hypoxic response pathways: regulation of the Hypoxia Inducible Transcription Factor. *Gene and development*. 2003; 17: 2614-2623.

2. Nangaku, M., Nishi, H., Miyata, T. Role of chronic hypoxia and hypoxia Inducible Factor in kidney disease. *Chinese Med. J.* 2008; 121 (3): 257-264.
3. Huang; L. E., Bunn, H. F. Hypoxia Inducible Factor and its biomedical relevance. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278 (22): 19575-19578.
4. Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R. et al. Protective role of hypoxia Inducible Factor 2 α against ischaemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1218-1226.
5. Corn, P. G. Role of the ubiquitin proteasom system in renal cell carcinoma. *BMC Biochemistry.* 2007; 8 (1): S4.
6. Thomas, J. D., Johannes, G. J. Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA J.* 2007; 13 : 1116-1131
7. Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann R, Jr., et al. RNA binding protein HuR and PTB promote the translation of HIF 1. *Mol Cell Biol.* 2008; 28 (10) : 93-107.
8. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *Journal of molecular medicine.* 2007; 85 (12): 1325-1330.
9. Semenza, GL. HIF 1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; 88:1474-1480
10. Weinberg, JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney International.* 1991; 39: 476-500
11. Ke, Q; Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 1469-1480
12. Haase, VH. HIF in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291: 271-281
13. O'Connor, PM. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clinical and experimental pharmacology and physiology.* 2006; 33: 961-967
14. Nangaku, M: Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 17-25
15. Nangaku, M, Fujuta, T. Activation of renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens res.* 2008; 31: 175-184
16. Weidwmann, A, et al. HIF activation protect from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 486-494
17. Wang, GL, et al. HIF 1 ia a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad sci USA.* 1995; 92: 5510-5514
18. Wang, GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *Journal of biological chemistry.* 1995; 20: 1230-1237
19. Nangaku, M. The heat is on: expanding role for Hypoxia-Inducible Factor in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:13-15
20. Srigondo B. Jumlah Ulangan dalam percobaan, dalam rancangan percobaan. Semarang: Universitas Diponegoro: 1981.
21. Soewoto H, M.Sadikin, M.M.Vita K, Septelia IW, Dwirini RG, Parwati AS, et al. Biokimia Eksperimen Laboratorium. Jakarta: Widya Medika, 2001:1-6
22. Bio-Rad Laboratorium. RT- PCR application guide book
23. Bio-Rad. Transblot guide book

24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4350-4354
25. Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981; 112(2):195-203.
26. Ferdinal F, et al. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran Hypoxia Inducible Factor-1 dalam regulasi ekspresi gen B-Type Natriuretic Peptide-45. Disertasi S3 biokimia dan Biologi Molekuler. Jakarta; FKUI; 2008.
27. Heidbreder, M; et al. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *The FASEB Journal*. *express article*. 2003. 10.1096/fj.02-0936fje.
28. Lidgren A, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α mRNA and Protein Levels in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer Molecules*. 2008; 4(5): 153-157.
29. Zou AP, Yang ZZ, Li PL, Cowley AW JR. Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1 α in renal medullary cells of rats. *Physiol Genomics*. 2001; 6(3):159-68.
30. Li HG, Ren YM, Guo SC, Cheng L, Wang DP, Yang J, Chang ZJ, Zhao XQ. The protein level of hypoxia-inducible factor-1 α is increased in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) inhabiting high altitudes. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol*. 2009; 311(2): 134-41
31. Heymen SN, et al. Renal Parenchymal Hypoxia, Hypoxia response and the Progression of Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol*. 2008; 28: 998-1006
32. Eipstein FH, Oxygen and Renal Metabolism. *Kidney International*. 1997; 51: 381-385
33. Manotham K, et al. A Biologic Role of HIF-1 α in the Renal Medulla. *Kidney International*. 2005; 67(4): 1428-29
34. Rachida S. BelAiba, et al. Hypoxia Up-Regulates HIF-1 transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor-B in Pulmonary Artery Smooth Muscle cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2007; 18: 4691-4697
35. Eckardt KU, et al. Hypoxia Inducible Factors and their role in renal disease. *Semin Nephrol*. 2007; 27(3): 363-72
36. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and HIF System in the kidney disease. *Journal of Molecular Medicine*. 2007; 85(12): 1325-1330
37. Storey KB, Storey JM. Oxygen limitation and metabolic rate depression. In: Storey KB, Editor. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. New Jersey: John-Wiley & Sons; 2004. 319-84
38. Stroka DM, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB Journal*. 2001; 15: 2445-2453
39. Dagher PC. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int*. 2004; 66(2):506-9
40. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol*. 2003; 23(6):511-21