

**EKSPRESI GEN *MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE*
PADA JANTUNG, OTAK DAN DARAH TIKUS YANG
DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK**

TESIS

**Untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M.Biomed)**

**SYARIFAH DEWI
NPM: 610501210Y**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BOKIMIA
JAKARTA
2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Syarifah Dewi

NPM : 610501210Y

Tanda Tangan :

The image shows a handwritten signature in black ink over a rectangular official stamp. The stamp contains the number '60' in a large font, the name 'SYARIFAH DEWI' in a smaller font, and a circular emblem with a Garuda bird, which is the logo of Universitas Indonesia. The signature appears to be 'Syarifah Dewi'.

Tanggal : 1 Desember 2008

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Syarifah Dewi
NPM : 610501210Y
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Ekspresi gen *manganese superoxide dismutase*
(MnSOD) pada jantung, otak dan darah tikus yang
diinduksi hipoksia sistemik

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr.rer physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi

(Septelia Inawati Wanandi)

Pembimbing II: dr. Sri Widia A. Jusman, MS

(Sri Widia A. Jusman)

Penguji I : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc

(Mohamad Sadikin)

Penguji II : Prof. dr. Frans D. Suyatna, SpFK, PhD

(Frans D. Suyatna)

Penguji III : Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD

(Purnomo Soeharso)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 1 Desember 2008

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

(Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas pertolongan-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Ekspresi gen manganese superoksida dismutase (MnSOD) pada jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Tesis ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master Biomedik dari Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PMIB FKUI).

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. rer. physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi selaku pembimbing pertama dan sebagai ketua PMIB FKUI, serta kepada dr. Sri Widia A. Jusman, MS selaku pembimbing kedua. Terima kasih atas bimbingan, arahan, kritik dan saran yang membangun serta waktu yang telah diluangkan kepada penulis sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Semoga apa yang telah diajarkan kepada penulis menjadi amal ibadah yang mendapat pahala dari Allah SWT.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk bekerja dan melakukan penelitian di sana, khususnya untuk dr. Sri Widia A. Jusman selaku ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler dan dr. Ani Retno Prijanti, MS selaku ketua kekhususan Biokimia serta seluruh staf pengajar dan staf administrasi yang berada di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Tidak lupa kepada teman-teman mahasiswa di Biomedik, khususnya di kekhususan Biokimia, terima kasih atas segala motivasi dan dukungannya. Akhirnya kepada suami dan anak yang tercinta, selalu mendampingi saat susah maupun senang dan selalu memberi semangat, orang tua serta kakak adik yang selalu memberikan doa dan restu, penulis mengucapkan banyak terima kasih.

Jakarta, Desember 2008

Syarifah Dewi

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

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

Nama : Syarifah Dewi
NPM : 610501210Y
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

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

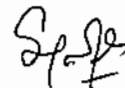
Ekspresi gen *manganese superoxide dismutase* (MnSOD) pada jantung, otak dan daraj tikus yang diinduksi hipoksia sistemik

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 1 Desember 2008

Yang menyatakan



Syarifah Dewi

EKSPRESI GEN *MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE* PADA JANTUNG, OTAK DAN DARAH TIKUS YANG DIINDUKSI HIPOKSIA SISTEMIK

ABSTRAK

Tujuan: Menganalisis ekspresi gen *manganese superoxide dismutase* (MnSOD) pada jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.

Desain: penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba.

Metode: Sampel penelitian ini adalah 25 ekor tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L*), yang dibagi menjadi 5 kelompok: kelompok I tikus tanpa perlakuan hipoksia sebagai kontrol, kelompok II, III, IV dan V adalah kelompok tikus dengan perlakuan hipoksia 10% O₂ selama 1, 7, 14 dan 21 hari. Setelah perlakuan tikus dimatikan, kemudian darah, otak dan jantung tikus diambil untuk diperiksa tingkat ekspresi mRNA dengan menggunakan *real time RT PCR* dengan pewarnaan *SYBR green*, serta diukur aktivitas spesifik MnSOD dengan menggunakan kit RanSOD® dengan ditambahkan NaCN untuk menghambat aktivitas CuZnSOD.

Hasil: Pada hipoksia awal (1 hari) ekspresi relatif mRNA MnSOD dan aktivitas spesifik MnSOD menunjukkan penurunan di darah dan jantung, sedangkan pada otak tidak terjadi penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa dalam keadaan hipoksia sistemik perlindungan antioksidan pada otak terjadi lebih awal dibandingkan jantung dan darah. Pada hipoksia awal di jantung dan darah, mulai terjadi peningkatan ROS sehingga aktivitas spesifik MnSOD menurun, namun belum dapat menstimulasi peningkatan ekspresi mRNA-nya. Pada hipoksia 1-14 hari baik ekspresi mRNA maupun aktivitas spesifik MnSOD pada ketiga jaringan tersebut mengalami peningkatan sejalan dengan lamanya hipoksia. Pada hipoksia lanjut (21 hari) terjadi korelasi negatif antara ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD di jantung dan darah. Hal ini mungkin disebabkan karena produksi ROS yang sangat masif, sehingga ekspresi mRNA terus ditingkatkan namun stres oksidatif belum dapat diatasi, sedangkan pada otak fenomena tersebut tidak terjadi. Hal ini diduga karena peningkatan ROS pada hipoksia lanjut masih dapat diatasi dengan aktivitas enzim MnSOD yang tersedia tanpa harus meningkatkan ekspresi mRNA-nya. Hasil ini menunjukkan bahwa otak cenderung lebih dilindungi dalam keadaan hipoksia sistemik dibandingkan jantung dan darah. Hasil analisis uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa perubahan ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada induksi hipoksia sistemik pada darah sejalan dengan perubahannya pada jantung dan otak.

Kesimpulan: Setiap jaringan mempunyai pola ekspresi gen MnSOD dan aktivitas MnSOD yang berbeda-beda pada kondisi hipoksia. Terdapat perbedaan regulasi ekspresi gen MnSOD antara hipoksia sistemik awal dan lanjut. Pengukuran ekspresi MnSOD (mRNA dan aktivitas spesifik) pada darah dapat sekaligus menggambarkan ekspresi tersebut pada jantung dan otak.

Kata kunci: hipoksia, ekspresi mRNA MnSOD, aktivitas MnSOD.

MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE GENE EXPRESSION IN RAT'S HEART, BRAIN BLOOD THAT IS INDUCED SYSTEMIC HYPOXIA

ABSTRACT

Background: The aim of this study is to determine the gene expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in rat's heart, brain and blood induced by systemic hypoxia.

Design: This study is an *in vivo* experimental study.

Method: This study was conducted on 25 male Sprague Dawley rats (*Rattus norvegicus L*) which were divided into 5 groups and subjected to systemic hypoxia by placing them in hypoxic chamber supplied by 10% O₂ for 0, 1, 7, 14, 21 days, respectively. Rats were sacrificed after treatment, and the blood, heart and brain were used for measurement of relative mRNA level of MnSOD with real time RT PCR and measurement of spesific activity of MnSOD enzyme using RanSOD® kit.

Result: Determination of gene expression of MnSOD (relative mRNA expression and spesific activity) in rat blood and heart cells under early hypoxic induction (1 day) resulted in the lower levels compared to the level in control group. After 1 day of hypoxic induction the gene expression level was then increased and again decreased under very late hypoxic condition (21 days) compared to the control. This suggests that the blood and heart cells at early hypoxia have not enough time to provide more MnSOD enzyme through gene expression to eliminate the sudden accumulation of ROS. In contrast to the results in heart and blood cells, the gene expression of MnSOD in brain cells were demonstrated to be increased since early systemic hypoxia (day 1) up to day 14, and tends to decrease under late hypoxic condition (day 21) although the level still slightly higher compared to the level in control group. Under late hypoxic condition (21 days), the capacity of MnSOD to eliminate the accumulated ROS has been saturated as found in brain cells, or even reduced to the lower level than in normal condition as found in blood and heart cells. This study could demonstrate that brain cells have different pattern of gene expression of MnSOD compared to blood and heart cells during several time points of hypoxic induction, particularly at early stage. It should also be considered that the levels of gene expression of MnSOD in each tissue were distinct although measured under the same condition. Analysis of Pearson correlation test shows that pattern of gene expression of MnSOD in blood cells is appropriate with the pattern in heart and brain cells under hypoxic condition.

Conclusion: Every tissue has the different pattern of gene expression of MnSOD (relative mRNA expression and spesific activity) under hypoxic condition. There is different regulation of MnSOD gene expression at early and late hypoxia. Analysis gene expression of MnSOD in blood cells could represent the analysis of gene expression of MnSOD in heart and brain cells under hypoxic condition.

Keywords: hypoxia, relative mRNA expression of MnSOD, spesific activity of MnSOD.

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Stres Oksidatif	6
2.1.1. Radikal bebas	6
2.1.2. Antioksidan	10
2.2. Hipoksia	11
2.2.1. <i>Hypoxia Inducible Factor-1</i> (HIF-1)	12
2.2.2. Produksi ROS dalam Keadaan Hipoksia	13

2.3. <i>Manganese Superoxide Dismutase</i> (MnSOD)	16
2.3.1. Gen MnSOD	17
2.3.2. Protein MnSOD	18
2.3.3. Aktivitas MnSOD	20
2.4. <i>Real Time</i> PCR	21

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Disain Penelitian	24
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3. Sampel Penelitian	24
3.4. Jumlah Sampel Penelitian	24
3.5. Bahan dan Alat Penelitian	25
3.5.1. Bahan Penelitian	25
3.5.2. Alat Penelitian	25
3.6. Cara Kerja	26
3.6.1. Persiapan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel	26
3.6.1.1. Aklimatisasi Hewan Coba	26
3.6.1.2. Perlakuan Tikus Menjadi Hipoksia	26
3.6.1.3. Pengambilan Jaringan Jantung, Otak dan Darah Tikus	26
3.6.2. Isolasi RNA Total dari Jaringan Jantung, Otak dan Darah	27
3.6.3. Desain Primer	28
3.6.4. Amplifikasi cDNA MnSOD	29
3.6.5. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	30
3.7. Analisis Uji Statistik	33

BAB IV HASIL DAN DISKUSI

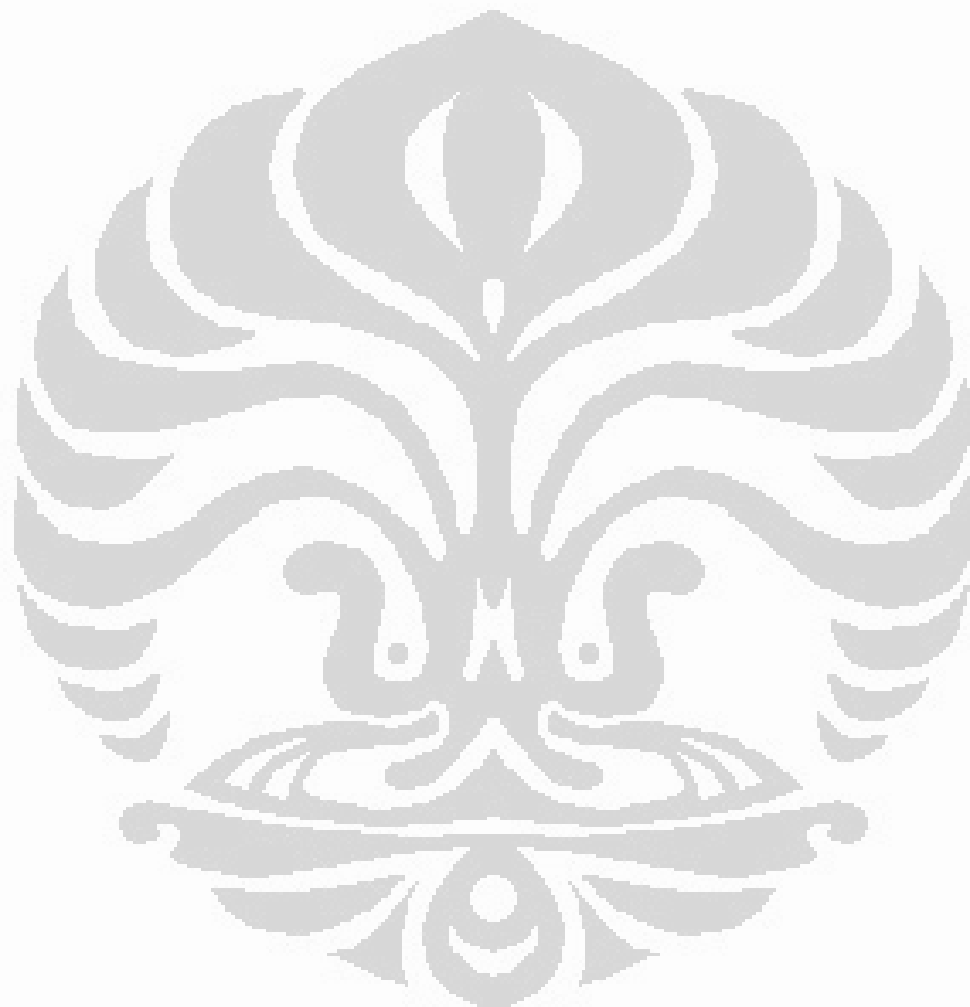
4.1. Induksi Hipoksia Sistemik pada Tikus	34
4.2. Analisis Ekspresi Gen MnSOD dengan <i>Real Time</i> RT PCR	34
4.3. Analisis Ekspresi Gen MnSOD pada Darah	36
4.4. Analisis Ekspresi Gen MnSOD pada Otak	40

4.5. Analisis Ekspresi Gen MnSOD pada Jantung	43
4.6. Hubungan Antara Ekspresi MnSOD pada Jantung dan Otak Dibandingkan dengan Darah Tikus Hipoksia Sistemik	46
4.7. Ekspresi Gen MnSOD pada Otak Dibandingkan dengan Jantung dan Darah Sebagai Respons terhadap Hipoksia Sistemik	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	53
5.2. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	59
USULAN ARTIKEL UNTUK JURNAL	90
BIODATA PENULIS	95

DAFTAR GAMBAR

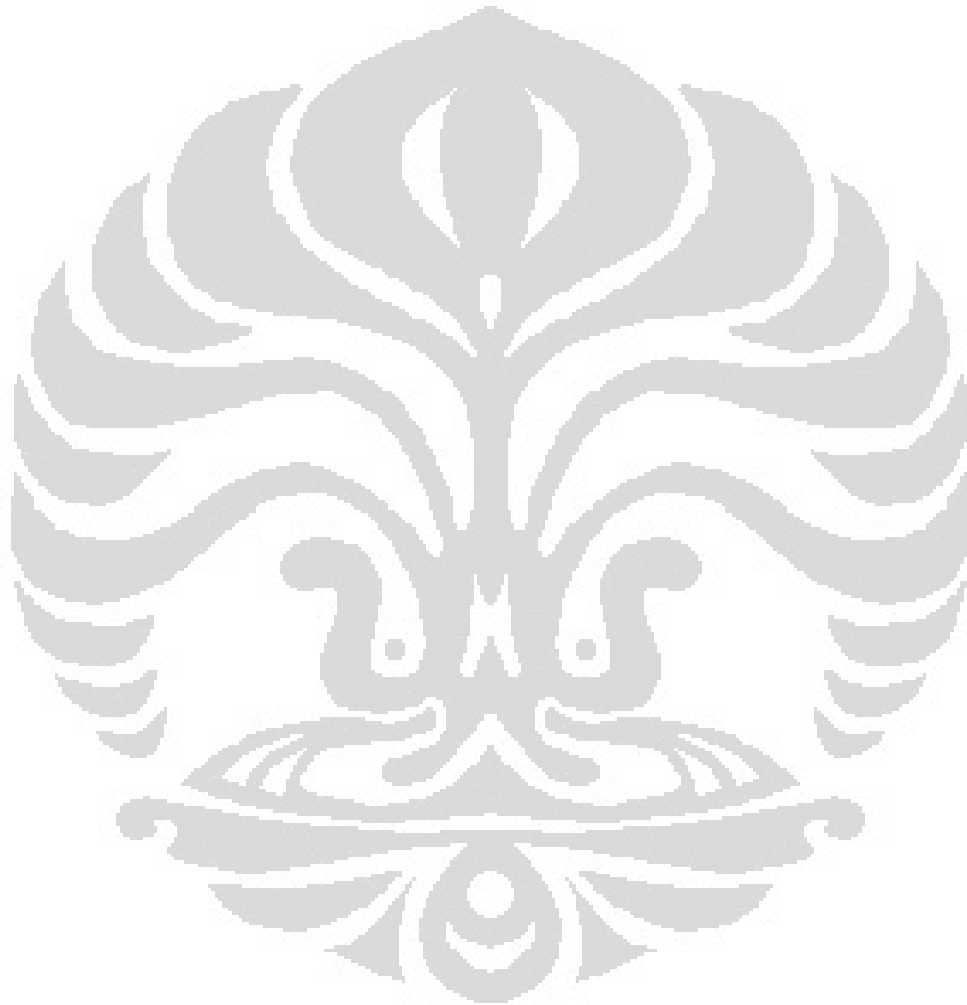
	Hal
Gambar 2.1	Pembentukan ROS pada rantai pernafasan di mitokondria 8
Gambar 2.2	Peran ROS dalam regulasi fungsi sel dan kerusakan oksidatif ... 9
Gambar 2.3	Reduksi Ubiquinon (Q) menjadi ubiquinol (QH ₂) 14
Gambar 2.4	Detoksifikasi ROS oleh SOD 16
Gambar 2.5	Situs aktif MnSOD 19
Gambar 2.6	Kurva fluoresens pada <i>real time</i> PCR 22
Gambar 3.1	Kandang untuk induksi hipoksia (<i>hypoxic chamber</i>) 27
Gambar 4.1	Kurva fluoresensi gen MnSOD, beta actin dan NTC 35
Gambar 4.2	<i>Melting curve</i> pada <i>real time</i> PCR 35
Gambar 4.3	Diagram batang tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD darah . 36
Gambar 4.4	Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD darah 37
Gambar 4.5	Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD darah 38
Gambar 4.6	Diagram batang tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD otak ... 40
Gambar 4.7	Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD otak 41
Gambar 4.8	Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD otak 42
Gambar 4.9	Diagram batang tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD jantung 43
Gambar 4.10	Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD jantung 44
Gambar 4.11	Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD jantung 45
Gambar 4.12	<i>Scatter plot</i> hubungan antara tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD jantung dengan darah 47
Gambar 4.13	<i>Scatter plot</i> hubungan antara tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD otak dengan darah 47

Gambar 4.14	<i>Scatter plot</i> hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD jantung dengan darah	48
Gambar 4.15	<i>Scatter plot</i> hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD otak dengan darah	49



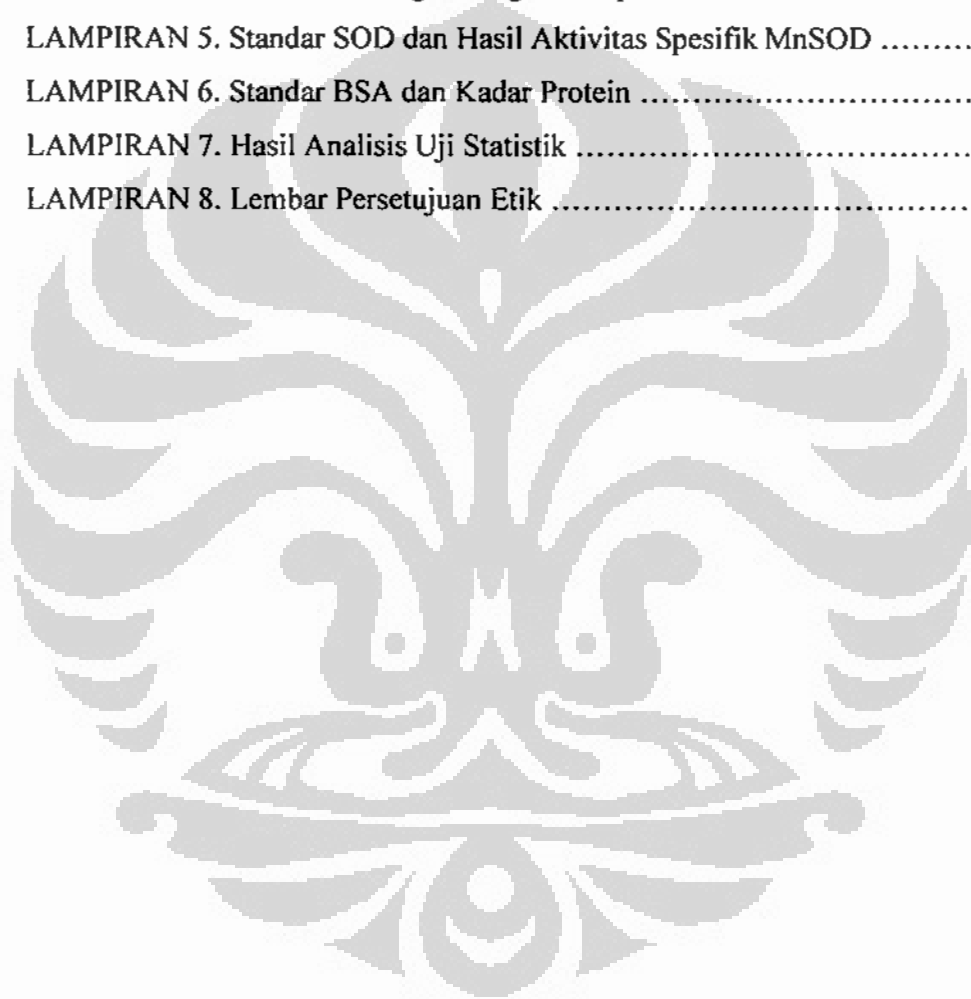
DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi reagen untuk pengukuran aktivitas MnSOD	32
--	----



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Data <i>Gene Bank</i>	59
LAMPIRAN 2. Desain Primer	68
LAMPIRAN 3. Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA	70
LAMPIRAN 4. Hasil Perhitungan Tingkat Ekspresi Relatif mRNA MnSOD	73
LAMPIRAN 5. Standar SOD dan Hasil Aktivitas Spesifik MnSOD	74
LAMPIRAN 6. Standar BSA dan Kadar Protein	78
LAMPIRAN 7. Hasil Analisis Uji Statistik	81
LAMPIRAN 8. Lembar Persetujuan Etik	89



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen di dalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel. Organisme aerob, dari prokariot sampai eukariot yang kompleks, mempunyai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia baik pada tingkat sistemik maupun seluler yaitu melalui penginderaan oksigen (*oxygen sensing*).^{1,2} Contohnya pada tingkat seluler penurunan kadar oksigen akan mengakibatkan aktivasi beberapa jalur metabolik yang tidak membutuhkan oksigen (induksi enzim glikolisis anaerob). Pada tingkat sistemik, pengaturan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan distribusi oksigen, seperti induksi eritropoiesis, angiogenesis dan hiperventilasi.^{3,4}

Saat ini di Indonesia telah terjadi pergeseran pola penyakit, dari penyakit infeksi ke arah penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskular, serebrovaskular dan kanker. Hal ini terjadi karena terjadi perubahan gaya hidup pada masyarakat kita yang menimbulkan resiko untuk mencetuskan penyakit-penyakit degeneratif. Beberapa faktor resiko tersebut diantaranya merokok, konsumsi alkohol, kurangnya aktivitas fisik, obesitas, tekanan darah tinggi, konsumsi makanan berlemak dan stres. Kondisi hipoksia dalam hal ini ikut terlibat dalam perkembangan patogenesis berbagai penyakit degeneratif khususnya yang disebabkan karena iskemia, di antaranya yaitu infark miokard, penyakit serebrovaskuler (stroke), kanker, penyakit paru obstruktif kronik dan gagal ginjal akut.^{5,6}

Salah satu respons sel terhadap kondisi hipoksia adalah peningkatan kadar protein *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1). HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Gen-gen yang diregulasi oleh HIF-1 di antaranya berhubungan dengan pengontrolan vasomotor (NOS2), angiogenesis (VEGF, FLT-1), pembentukan sel darah merah dan metabolisme besi (EPO, reseptor transferin, seruloplasmin), proliferasi sel (IGF-1, IGFBP-1, TGF β) dan metabolisme

energi (GLUT 1-3, fosfoenolpiruvat karboksilase, laktat dehidrogenase A, aldolase, fosfoglukokinase-1, piruvat kinase, enolase, prolil 4-hidroksilase dan adrenomedullin). Karena begitu banyaknya gen yang menjadi target dari HIF-1 ini dan sebagian besar gen merupakan gen yang vital dalam fungsional tubuh, maka faktor transkripsi ini mempunyai peranan penting terutama dalam keadaan hipoksia.^{7,8}

Pada keadaan hipoksia akan terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS), seperti superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). ROS merupakan senyawa radikal bebas yang molekul oksigennya mempunyai elektron yang tidak berpasangan dan bersifat sangat reaktif. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ROS ikut berpartisipasi dalam jalur transduksi sinyal hipoksia serta berperan dalam menstabilkan HIF-1 α .² Hal ini disebabkan karena konsumsi oksigen oleh sitokrom c oksidase (kompleks IV mitokondria) menurun sehingga terjadi akumulasi ROS pada kompleks III mitokondria. Kadar ROS yang tinggi menginduksi stabilisasi HIF-1 α , sebaliknya kadar ROS yang rendah akan menyebabkan degradasi HIF-1 α . Penghambatan ROS dalam keadaan hipoksia menghambat pengaktifan transkripsi gen-gen yang diinduksi hipoksia. Sebaliknya sel-sel dalam keadaan normoksia yang diberikan oksidan, mengaktifkan gen-gen yang diinduksi hipoksia.²

Setiap organisme aerob memiliki mekanisme dalam mengatur kadar radikal bebas, yaitu melalui sistem antioksidan. Antioksidan adalah molekul yang dapat mencegah proses oksidasi yang dimediasi oleh radikal bebas. Ada sejumlah antioksidan enzimatik dalam tubuh, diantaranya yaitu superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase. Sistem antioksidan ini dapat mencegah oksidasi molekul biologis oleh radikal bebas sehingga dapat mencegah timbulnya stres oksidatif.⁹

Superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif oleh radikal bebas. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Hidrogen peroksida selanjutnya didetoksifikasi menjadi air oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase.

Pada sel eukariotik terdapat tiga isoform SOD yaitu Cu/ZnSOD, SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan MnSOD (*Manganese-Superoxide Dismutase*).⁹

MnSOD merupakan enzim antioksidan utama yang terdapat di matriks mitokondria. Rantai transpor elektron di mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS endogen. MnSOD ini memodulasikan status redoks seluler dengan mengubah anion superoksida menjadi H₂O₂ dan oksigen. Penurunan kadar MnSOD, sebagai satu-satunya *scavenger* O₂⁻, dapat menyebabkan peningkatan kadar ROS dalam mitokondria sehingga terjadi stres oksidatif.⁹ Dari suatu penelitian dilaporkan bahwa ekspresi MnSOD dapat diinduksi oleh stres eksogen,¹⁰ sedangkan Cu/Zn SOD merupakan enzim konstitutif.

Ada beberapa penelitian yang melihat ekspresi MnSOD pada hipoksia, diantaranya adalah penelitian Russel (1995) yang membuktikan bahwa aktivitas MnSOD pada mencit jantan dalam kondisi hipoksia (10% oksigen selama 7 hari) menurun secara signifikan, sedangkan ekspresi mRNA MnSOD tidak mengalami perubahan dibandingkan dengan kontrol.¹¹ Namun di sisi lain ada yang meneliti pengaruh MnSOD pada hipoksia, yaitu penelitian Wang (2005) yang membuktikan bahwa MnSOD menekan akumulasi protein HIF-1 α pada sel MCF-7 kanker payudara manusia.¹² Pada penelitian tersebut juga diungkapkan bahwa MnSOD akan mencegah adaptasi sel terhadap hipoksia, salah satu respons yang dilihat adalah penurunan VEGF.

Walaupun penelitian mengenai MnSOD telah banyak dilakukan, namun belum ada yang meneliti perbandingan ekspresi gen MnSOD dalam keadaan hipoksia sistemik pada jaringan-jaringan yang penting, seperti otak, jantung dan darah. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan analisis bagaimana perbandingan gambaran ekspresi gen MnSOD pada beberapa jaringan tikus yang diinduksi hipoksia sistemik, yaitu darah, otak dan jantung.

1.2. Rumusan Masalah

Permasalahan yang timbul dari latar belakang di atas yaitu bagaimana ekspresi gen MnSOD pada jaringan yang hipoksia? Bagaimana hubungan ekspresi

mRNA MnSOD dengan aktivitas spesifik MnSOD pada jaringan yang hipoksia? Bagaimana hubungan ekspresi MnSOD pada darah dengan jaringan lain?.

1.3. Hipotesis

1. Terdapat perbedaan pola ekspresi gen MnSOD antara jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
2. Pola ekspresi gen MnSOD pada darah dalam keadaan hipoksia sistemik dapat menggambarkan kondisi hipoksia pada jantung dan otak.

1.4. Tujuan penelitian

Tujuan Umum

1. Menganalisis ekspresi gen MnSOD pada jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.

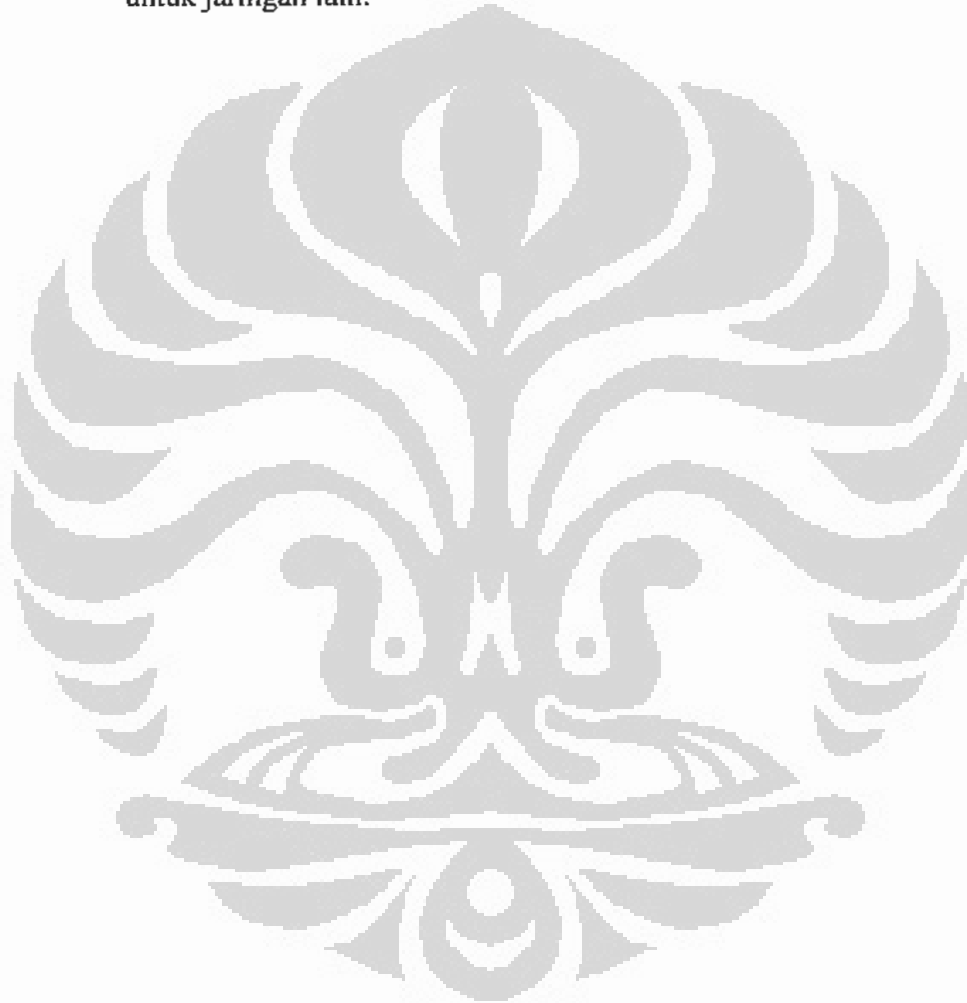
Tujuan Khusus

1. Menentukan secara kuantitatif jumlah mRNA MnSOD pada jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
2. Menentukan aktivitas spesifik MnSOD pada jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
3. Menganalisis hubungan antara ekspresi gen MnSOD dengan aktivitas spesifik MnSOD pada jaringan jantung, otak dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.
4. Menganalisis hubungan ekspresi MnSOD pada darah dengan ekspresi MnSOD pada otak dan jantung yang diinduksi hipoksia sistemik.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Mengetahui respons jaringan terutama otak dan jantung terhadap keadaan hipoksia sistemik sehingga dapat menambah informasi mengenai patogenesis terjadinya stroke dan infark miokard.

2. Mengetahui peran MnSOD pada keadaan hipoksia sistemik melalui pemahaman regulasi ekspresi gen sehingga dapat menjadi pertimbangan penatalaksanaan keadaan hipoksia terutama pada jaringan otak dan jantung dengan pemberian suplemen antioksidan (SOD).
3. Memonitor ekspresi MnSOD pada darah, apakah dapat dijadikan indikator untuk jaringan lain.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Stres Oksidatif

Pada organisme yang sehat, produksi radikal bebas yang tinggi akan diimbangi oleh sistem pertahanan antioksidan untuk mencegah kerusakan sel. Keadaan stres oksidatif menggambarkan ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan pertahanan antioksidan dalam tubuh. Contohnya pada gangguan sistem antioksidan yang dapat berupa represi protein yang berperan sebagai antioksidan atau adanya paparan oksidatif seperti radiasi, infeksi, atau metabolisme zat kimia. Pada prinsipnya, stres oksidatif merupakan hasil dari berkurangnya antioksidan dan atau meningkatnya produksi radikal bebas.¹³

Tubuh memiliki mekanisme dalam mengatasi radikal bebas, yaitu melalui sistem antioksidan. Antioksidan adalah molekul yang dapat mencegah proses oksidasi yang dimediasi oleh radikal bebas. Ada sejumlah sistem antioksidan enzimatik dalam tubuh, yaitu enzim primer (superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase) dan enzim sekunder (glutathion reduktase, sistem glutathion, glutareksin dan tioredoksin). Selain itu ada pula antioksidan non enzimatik diantaranya yaitu vitamin C dan vitamin E. Sistem antioksidan mencegah radikal bebas untuk mengoksidasi molekul biologis sehingga diduga hal ini dapat memperlambat proses penuaan dan mencegah berbagai penyakit.^{9,14}

Gangguan keseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan, dimana radikal bebas lebih banyak daripada antioksidan, berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan. Kondisi ini disebut dengan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan terhadap berbagai molekul biologis, seperti DNA, protein, lipid dan akhirnya adalah kematian sel.¹³

2.1.1. Radikal Bebas dan *Reactive Oxygen Species*

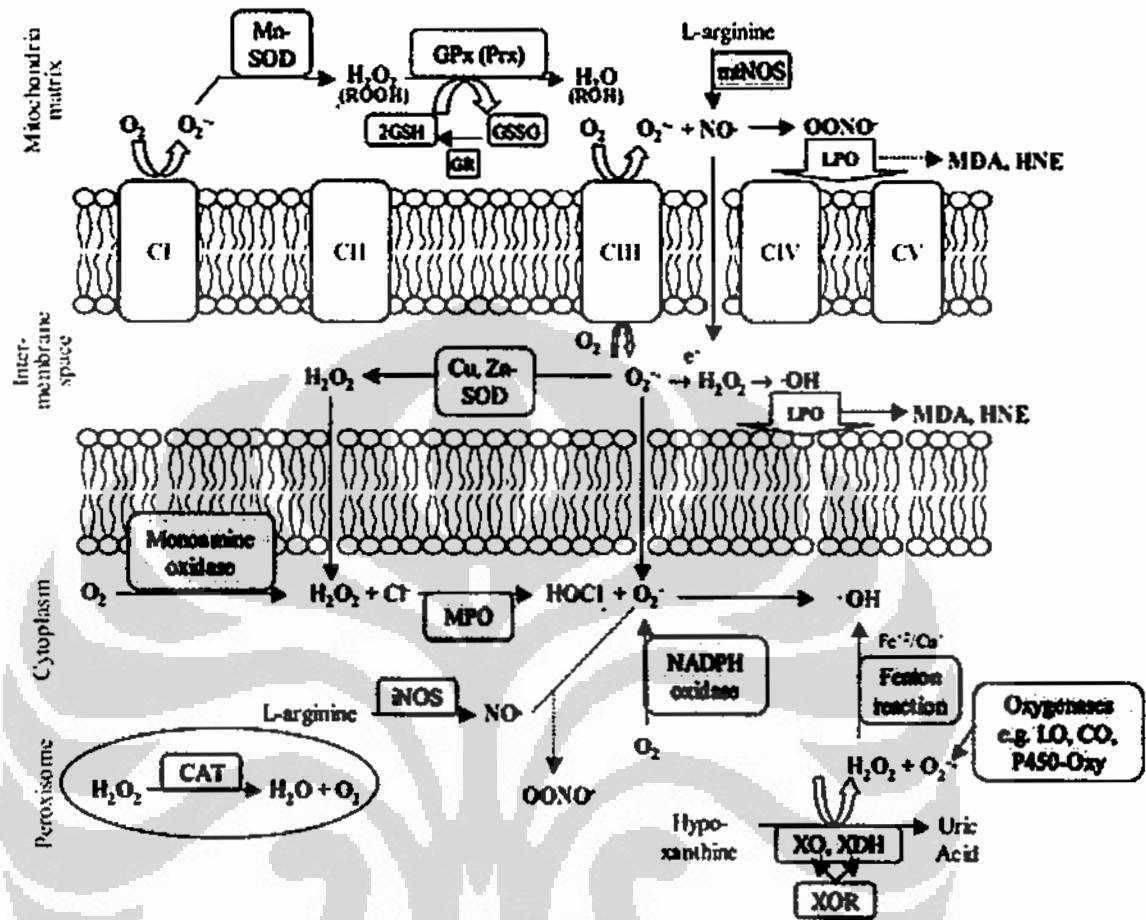
Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Elektron tidak

berpasangan adalah elektron tunggal dalam suatu orbital. Elektron tidak berpasangan ini bertanggung jawab pada ketidakstabilan dan reaktivitas yang tinggi pada radikal bebas. Adanya elektron tidak berpasangan pada radikal bebas menyebabkan elektron tersebut mudah bereaksi dengan molekul lain dengan cara mengikat elektron yang terletak di orbit terluarnya sehingga membuat molekul tersebut menjadi reaktif.¹³

Reactive oxygen species (ROS) merupakan istilah yang ditujukan untuk senyawa-senyawa turunan O₂ baik yang bersifat radikal maupun tidak. Jadi semua radikal oksigen merupakan ROS, tetapi tidak semua ROS itu merupakan radikal oksigen. Molekul-molekul yang termasuk ke dalam ROS diantaranya yaitu radikal hidroksil (OH[•]), alkoksil (RO[•]) atau peroksil (ROO[•]) yang mempunyai waktu hidup yang singkat, juga termasuk superoksida (O₂^{•-}) atau radikal nitroksil (NO[•]) yang mempunyai waktu hidup sedang. Selain itu senyawa non radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), hidroperoksida organik (ROOH) dan asam hipoklorit (HOCl) juga termasuk ke dalam kelompok ROS.¹⁵

ROS dibentuk sebagai hasil dari metabolisme normal yang menggunakan oksigen dan mempunyai peran penting dalam sinyal sel. Selain itu ROS juga diproduksi dari sumber eksogen seperti radiasi ionisasi. Pada sel-sel yang mengalami inflamasi, ROS juga dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan dalam melawan bakteri.^{13,16}

Pada kondisi normal, sel hidup membentuk ROS sebagai hasil metabolisme tubuh. Bagian utama yang menghasilkan radikal oksigen adalah rantai transpor elektron di mitokondria (lihat gambar 2.1). Mitokondria merupakan organel yang merubah energi menjadi bentuk yang siap pakai yaitu ATP (adenosin trifosfat). Proses pembentukan ATP di mitokondria disebut sebagai fosforilasi oksidatif, yang melibatkan transpor proton (ion hidrogen) melintasi membran dalam mitokondria dengan menggunakan rantai transpor elektron. Pada rantai transpor elektron, elektron dihantarkan oleh sekelompok protein (enzim) melalui reaksi oksidasi-reduksi.^{17,18}

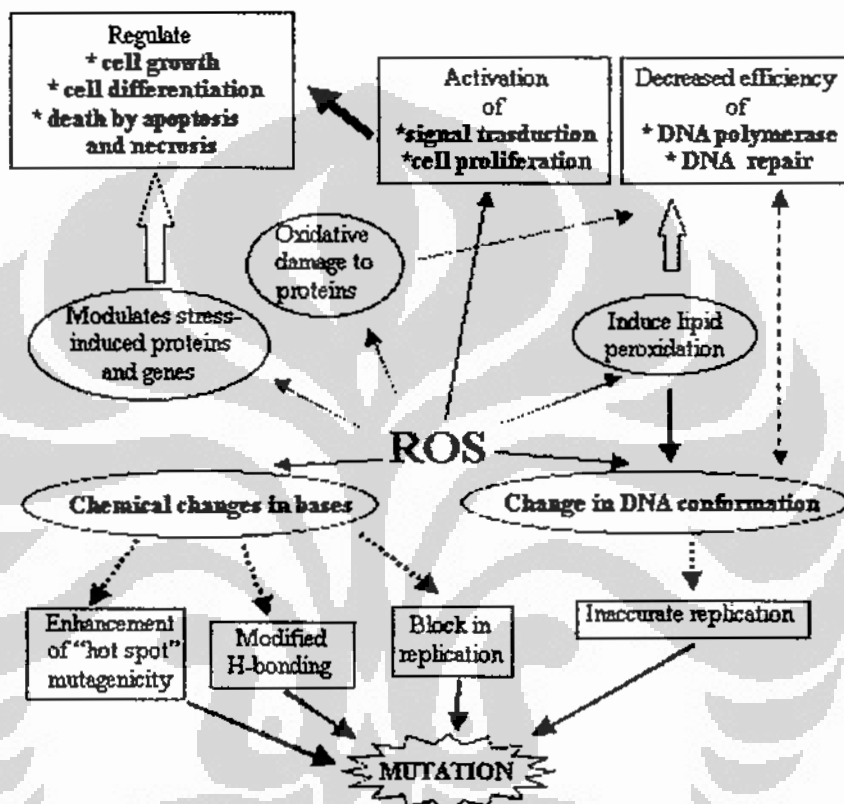


Gambar 2.1. Pembentukan ROS pada rantai pernafasan di mitokondria dan pengontrolannya oleh antioksidan.¹⁸

Efek ROS pada metabolisme sel telah banyak diketahui di berbagai spesies. ROS berperan pada *redox signaling* atau *oxidative signaling*. Bukan hanya berperan pada apoptosis, ROS ini juga mempunyai efek positif, diantaranya adalah menginduksi gen-gen kekebalan tubuh serta memobilisasi sistem transpor ion (gambar 2.2). Pada saat terjadi luka, ROS akan dilepaskan untuk merekrut platelet lain ke tempat luka, selain itu sistem imun adaptif akan teraktifkan dengan cara menarik leukosit.¹⁶

Pada beberapa penelitian mengenai ROS seperti superoksida dan hidrogen peroksida dilaporkan bahwa ROS mempunyai peran dalam transduksi sinyal dalam beberapa sistem.¹⁹ Karena oksigen merupakan komponen utama dalam molekul ini,

sehingga keberadaannya sangat dipengaruhi oleh konsentrasi oksigen lingkungan. Beberapa peneliti melaporkan adanya hubungan yang dekat antara kadar oksigen dan hidrogen peroksida dengan kecepatan produksi eritropoietin pada sel hepatoma.²⁰



Gambar 2.2. Peran ROS dalam regulasi fungsi sel dan kerusakan oksidatif.¹⁶

Namun kadar ROS yang meningkat drastis dapat merusak struktur sel. Kondisi ini disebut juga sebagai stres oksidatif. Pada keadaan ini, ROS mengakibatkan kerusakan pada DNA (misalnya pemutusan rantai DNA), peroksidasi lipid, modifikasi protein, disrupsi membran, kerusakan mitokondria. Kerusakan-kerusakan tersebut dapat mengakibatkan timbulnya berbagai penyakit. Hal ini disebabkan karena elektron yang tidak berpasangan pada ROS memerlukan tambahan elektron, sehingga ROS akan mengambil elektron dari molekul terdekatnya.^{16,21}

2.1.2. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu substansi dalam konsentrasi rendah, yang dapat mengalami oksidasi sehingga menghambat atau mencegah oksidasi suatu senyawa yang dilindungi. Komposisi antioksidan berbeda pada berbagai jaringan dan tergantung pula pada jenis sel. Antioksidan ini dapat diinduksi pembentukannya oleh adanya paparan radikal bebas pada suatu organisme. Berbagai mekanisme kerja antioksidan dalam melindungi tubuh diantaranya adalah:⁹

1. sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi pemusnahan radikal bebas (superoksida dismutase, katalase, peroksidase)
2. merupakan protein yang meminimalkan kemampuan pro-oksidan dengan cara mengikat ion logam (transferin, haptoglobin, haemopeksin)
3. sebagai molekul kecil yang memusnahkan radikal bebas (bilirubin, asam urat, glutathion)

Berdasarkan cara antioksidan diperoleh, maka dapat diklasifikasikan menjadi:⁹

1. antioksidan endogen yang terdiri dari
 - enzim-enzim (superoksida dismutase, katalase, peroksidase dan glutathion reduktase)
 - senyawa lain yang disintesis dalam tubuh (glutathion, bilirubin, asam urat)
2. antioksidan eksogen yang terdiri dari
 - mikronutrien seperti berbagai vitamin (vitamin C, E) dan senyawa lainnya seperti flavonoid, fenol, baik yang terdapat dalam sayuran, buah-buahan dan rempah maupun sebagai suplemen.
 - antioksidan sintetik (*butylated-hydroxy-anisole*, *butylated-hydroxy-toluene*, *Trolox* dll.)
 - senyawa yang digunakan dalam klinik sebagai obat dan memiliki aktivitas antioksidan *in vivo* (penisilamin, tetrasiklin, fenilbutazon, simetidin dll.)

Sebagai usaha untuk menangkal kerja dan menahan perluasan radikal bebas, sistem antioksidan dalam sel baik enzimatik dan nonenzimatik akan bekerja. Jumlah radikal bebas yang tinggi dalam tubuh akan mengakibatkan kadar senyawa antioksidan menurun salah satunya superoksida dismutase (SOD).

2.2. Hipoksia

Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen, yang merupakan keadaan cekaman (*stress*) lingkungan yang berat dan mengancam kelangsungan hidup sel. Seluruh organisme aerob mempunyai kemampuan menjaga homeostasis oksigen untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Secara fisiologis, tubuh akan selalu menjaga oksigenasi yang optimal ke semua sel di seluruh tubuh. Organisme aerob mengembangkan berbagai mekanisme untuk penginderaan oksigen dan memberikan respons terhadap keadaan hipoksia. Pengaturan ini dilakukan baik pada tingkat sistemik maupun tingkat seluler.^{1,2}

Pada tingkat sistemik, pengaturan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan distribusi oksigen, seperti induksi eritropoiesis, angiogenesis dan hiperventilasi. Pendeteksian kadar oksigen dilakukan dengan adanya kemoreseptor spesifik yang meregulasi laju kardiovaskuler dan ventilasi. Pada keadaan rendah oksigen, beberapa sistem kemosensorik teraktifkan, yang menghasilkan peningkatan ventilasi pulmoner dan sirkulasi darah untuk menjaga suplai oksigen ke jaringan agar tetap optimal. Respons ini merupakan jawaban atas terangsangnya sel kemoreseptor yang berada pada badan karotis di pembuluh arteri dan badan neuroepitel yang berada pada saluran nafas, serta merupakan respons langsung otot polos pembuluh darah terhadap hipoksia.^{1,22}

Pada tingkat seluler, penurunan kadar oksigen mengaktifasi beberapa jalur metabolik yang tidak membutuhkan oksigen (induksi enzim glikolisis anaerob). Seluruh sel yang berinti mendeteksi kadar oksigen dan memberikan respon terhadap penurunan oksigen yang akut yaitu melalui pengaktifan protein, maupun terhadap penurunan oksigen yang kronik yaitu melalui pengaturan transkripsi gen. Salah satu respons sel terhadap kondisi hipoksia di antaranya yaitu dengan meningkatnya kadar protein *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1). HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik.^{1,22}

2.2.1. *Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)*

HIF-1 merupakan molekul heterodimer, terdiri dari subunit α dan subunit β yang dikenal sebagai ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Tiap subunit pada bagian terminal amino, mengandung domain *basic helix-loop-helix* (bHLH) dan domain homologi PER-ARNT-SIM (PAS). Domain bHLH dan PAS ini dibutuhkan dalam pembentukan heterodimer antara subunit α dan subunit β untuk dapat berikatan dengan DNA.^{3,8}

Subunit β (HIF-1 β) diekspresikan secara konstitutif dan terdapat di dalam inti sel, aktivitasnya tidak dipengaruhi kondisi hipoksia, sedangkan subunit α (HIF-1 α) diinduksi secara khusus sebagai respons terhadap keadaan hipoksia. Dengan demikian HIF-1 α dianggap sebagai regulator utama homeostasis oksigen karena stabilitas dan aktivitasnya dipengaruhi oleh kadar oksigen. Stabilitas dan aktivitas HIF-1 α diatur oleh beberapa modifikasi pasca translasi, yaitu hidroksilasi pada residu prolin spesifik yang menyebabkan terjadi ubiquitinasi (melalui protein pVHL) dan subunit α tersebut didegradasi oleh proteasom. Selain itu hidroksilasi dari residu asparagin akan menghambat aktivitas transkripsi dari HIF-1 dengan menghambat interaksinya dengan koaktivator. Sebaliknya dalam keadaan hipoksia, hambatan hidroksilasi residu prolin akan menyebabkan HIF-1 α stabil, dan berkurangnya hidroksilasi residu asparagin meningkatkan aktivitas transkripsinya. Dengan demikian aktivitas HIF-1 sangat ditentukan oleh subunit α , di mana protein ini akan dipertahankan dalam keadaan hipoksia dan didegradasi dalam keadaan normoksia.^{3,8}

Konsensus sekuens DNA untuk terjadinya pengikatan HIF-1 berbagai gen pada kondisi hipoksia yaitu 5'-(A/G)CGTG-3'.³ Daftar gen yang diaktivasi oleh HIF-1 terus bertambah termasuk gen dimana produk proteinnya berfungsi dalam memelihara kondisi O₂ homeostasis dan untuk beradaptasi dengan perubahan konsentrasi oksigen. Kelompok pertama adalah gen yang terlibat dalam fungsi dan perkembangan dari sistem vaskularisasi baik mempromosikan angiogenesis (seperti VEGF dan reseptornya) maupun memodulasi sistem vaskular (seperti penginduksi *nitric oxide synthase*, *heme oxygenase-1*, *endothelial-1*, *adrenomedullin*, dan *α 1B-adrenergic receptor*).^{3,8}

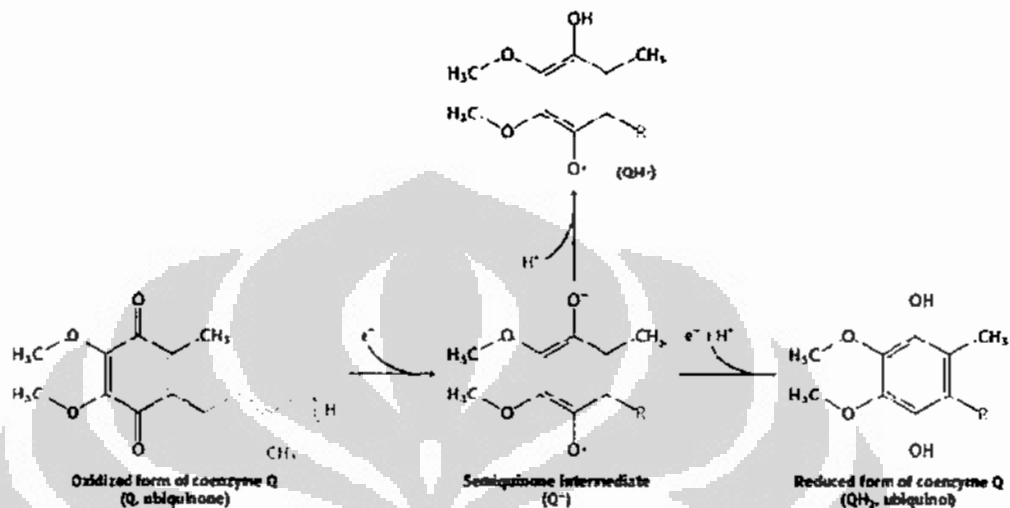
Kelompok kedua adalah gen yang produk proteinnya menginduksi proses eritropoiesis. Selain eritropoietin, HIF-1 juga meregulasi ceruloplasmin, transferin, dan reseptor transferin yang memfasilitasi suplai besi kepada jaringan eritroid.³ Kelompok ketiga adalah gen dengan produk proteinnya terlibat pada proses metabolisme energi yang meningkatkan pengambilan glukosa dan mengantarkan ke proses glikolisis sebagai sumber utama energi. Kelompok keempat adalah gen dengan produk protein yang bertanggung jawab terhadap proliferasi dan viabilitas sel.^{3,23}

2.2.2. Produksi ROS dalam Keadaan Hipoksia

Ada dua pendapat mengenai produksi ROS dalam keadaan hipoksia. Yang pertama yaitu bahwa ROS diproduksi oleh sebuah NADPH oksidase yang mereduksi O_2 menjadi anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), yang kemudian akan diubah menjadi hidrogen peroksida oleh SOD. Berdasarkan pendapat ini, bila terdapat keadaan rendah oksigen, maka akan kadar ROS juga akan menurun. Penurunan kadar ROS ini memberikan sinyal baik langsung maupun tidak langsung untuk aktivasi protein HIF-1.³ Hal ini dibuktikan oleh Salceda & Caro (1997), yang melaporkan pada pemberian katalase atau antioksidan eksogen akan menginduksi gen target HIF-1.²⁴

Pendapat kedua yaitu dalam keadaan hipoksia terjadi peningkatan produksi ROS oleh mitokondria, yang akan memberi sinyal pada stabilisasi HIF-1 α . Berdasarkan pendapat ini, kondisi hipoksia menurunkan konsumsi oksigen pada sitokrom c oksidase (kompleks IV mitokondria), sehingga terjadi akumulasi ROS pada kompleks III mitokondria.³ Pada pembentukan ubiquinol dari ubiquinon pada mitokondria, radikal bebas (ubisemiquinon) akan diproduksi selama proses transpor elektron (gambar 2.3). Radikal bebas ini berpotensi menyumbangkan elektron yang tidak berpasangannya ke molekul O_2 , sehingga memproduksi superoksida. Selama hipoksia proses pembentukan ROS dari tempat tersebut dapat meningkat. Sebaliknya, jika transpor elektron mitokondria dihambat pada tempat yang lebih proksimal oleh inhibitor seperti rotenone, DPI atau myxothiazol, ubiquinon akan teroksidasi sempurna sehingga pembentukan ROS pada kompleks III dapat berkurang.

Berdasarkan percobaan ini, produksi ROS pada kompleks III meningkat pada kondisi hipoksia, dan oksidan ini mencetuskan jalur sinyal pada hipoksia.⁶



Gambar 2.3. Reduksi Ubiquinon (Q) menjadi ubiquinol (QH₂) melewati bentuk intermediet anion semiquinon (Q^{•-}).⁶

Paul Schumacker (2003) melaporkan bahwa hipoksia menstimulasi pelepasan ROS dari mitokondria yang kemudian dapat meregulasi respons transkripsi dan post transkripsi terhadap kondisi oksigen yang rendah.²⁵ Penghambatan ROS pada hipoksia, menghambat respons transkripsi terhadap hipoksia. Pada penelitian lain juga membuktikan bahwa dalam keadaan hipoksia terjadi peningkatan radikal bebas yang dilihat dengan menggunakan probe fluoresensi, dan terjadi penurunan bila diberikan glutation.²⁶

Chandel (1998) meneliti apakah mitokondria berperan sebagai sensor oksigen selama hipoksia dan apakah hipoksia dan CO mengaktifkan transkripsi yang disebabkan oleh peningkatan produksi ROS. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada sel Hep3B *wild type* terjadi peningkatan produksi ROS selama hipoksia atau pada inkubasi dengan CoCl₂.²⁷ Pada sel Hep3B yang tidak mempunyai DNA mitokondria (p⁰), terjadi kegagalan respirasi dan tidak dapat mengaktifkan mRNA eritropoietin, enzim-enzim glikolisis dan VEGF selama hipoksia serta tidak terjadi peningkatan produksi ROS selama hipoksia.

Sel-sel ρ^0 bila diinduksi dengan CoCl_2 terjadi peningkatan produksi ROS. Pemberian antioksidan *pyrrolidine dithiocarbamate* (PDTC) dan *ebselen* (mirip dengan glutathion peroksidase), akan menghilangkan aktivasi gen-gen yang diinduksi hipoksia selama hipoksia atau selama inkubasi CoCl_2 pada sel *wild type*, selain itu juga menghilangkan respons terhadap CoCl_2 pada sel ρ^0 . Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa hipoksia mengaktifkan transkripsi gen melalui sinyal yang tergantung mitokondria dan melibatkan ROS, sedangkan aktivasi transkripsi yang diinduksi CoCl_2 distimulasi oleh produksi ROS melalui mekanisme yang tidak tergantung mitokondria.²⁸

Pada penelitian Chandel (1998) melaporkan bahwa kadar ROS yang tinggi menginduksi stabilisasi HIF-1 α , sebaliknya kadar ROS yang rendah akan menyebabkan degradasi HIF-1 α . Pada pemberian inhibitor kompleks I dan III mitokondria, terjadi hambatan induksi HIF-1 pada keadaan hipoksia (karena produksi ROS dihambat). Sedangkan pada pemberian inhibitor kompleks IV mitokondria dilaporkan dapat menginduksi aktivitas HIF-1 pada keadaan normoksia.²⁷ Penghambatan ROS dalam keadaan hipoksia menghambat pengaktifan transkripsi gen-gen yang diinduksi hipoksia. Sebaliknya sel-sel dalam keadaan normoksia yang diberikan oksidan, mengaktifkan gen-gen yang diinduksi hipoksia.^{28,29}

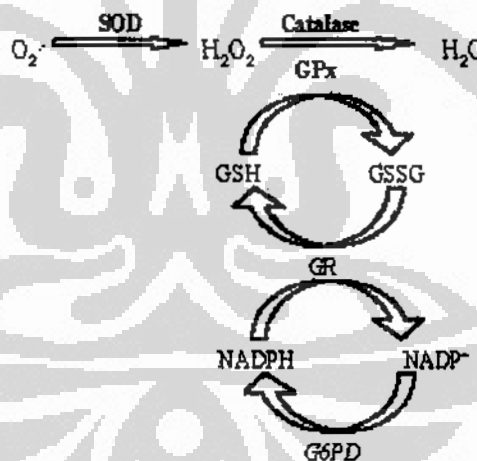
Pada keadaan hipoksia, jika durasi waktu kurangnya oksigen tidak terlalu lama, maka jaringan yang hipoksia dapat diselamatkan dengan pemberian oksigen kembali (reoksigenasi). Namun pada awal tahun 1980-an, dilaporkan bahwa reperfusi pada jaringan yang iskemia akan menambah kerusakan pada jaringan yang hipoksia (*reoxygenation injury*). Hal ini disebabkan karena ledakan produksi ROS akibat reoksigenasi.³⁰

Hampir seluruh aktivitas xantin yang mengoksidasi berbentuk dehidrogenase dalam jaringan yang sehat, yang mentransfer elektron ke NAD^+ bukan ke O_2 . Xantin dehidrogenase ini mengoksidasi xantin atau hipoxantin menjadi asam urat. Ketika terjadi kerusakan jaringan, xantin dehidrogenase diubah menjadi xantin oksidase, melalui oksidasi gugus $-\text{SH}$ atau dengan proteolisis terbatas. Proteolisis ini merubah struktur xantin dehidrogenase yang menghambat tempat pengikatannya dengan

NAD^+ dan menghantarkan elektronnya ke molekul O_2 . Xantin oksidase ini akan mengoksidasi xantin atau hipoxantin ketika terjadi reoksigenasi, dan menghasilkan anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dan bila terdapat ion logam transisi dapat menghasilkan radikal hidroksil (OH^{\cdot}).³⁰

2.3. *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)*

Superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan endogen yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Hidrogen peroksida selanjutnya didetoksifikasi menjadi air oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase (gambar 2.4). Hidrogen peroksida berbahaya bagi sel karena dapat dengan mudah berubah menjadi radikal hidroksil (melalui reaksi dengan Fe^{2+} , yang dikenal sebagai reaksi Fenton). Radikal hidroksil merupakan salah satu radikal bebas yang paling reaktif.⁹



Gambar 2.4. Detoksifikasi ROS oleh SOD.⁹

Superoksida dismutase (SOD, EC. 1.15.1.1) ditemukan pada semua organisme aerob, baik prokariot maupun eukariot. Enzim ini tergolong metaloprotein, mengandung ion logam (Fe, Ni, Cu, Zn, Mn) pada pusat aktifnya. Pada sel eukariotik terdapat tiga isoform SOD yaitu *copper-zinc* SOD (Cu/ZnSOD), SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan MnSOD (*Manganese-Superoxide Dismutase*).⁹

CuZnSOD atau dikenal sebagai SOD 1, isoform ini terdapat di sitoplasma dengan aktivitas paling besar (70-80% dari aktivitas SOD sel). Kedua yaitu MnSOD atau dikenal sebagai SOD 2, isoform ini terdapat di mitokondria dengan aktivitas sekitar 10-20% dari aktivitas SOD sel. Ketiga yaitu ECSOD atau dikenal sebagai SOD 3, terdapat dalam cairan ekstraseluler.¹⁴

Di antara ketiga isoform SOD, MnSOD merupakan enzim yang pertama dan utama dalam menangkal toksisitas radikal superoksida. Pertahanan kedua yaitu CuZnSOD yang terdapat di sitosol. Isoform ini mendukung fungsi perlindungan dari MnSOD dengan menetralsir superoksida yang bocor dari mitokondria ke sitosol. Fungsi ECSOD adalah menetralsir superoksida yang berada di permukaan sel serta di cairan dan matriks ekstraseluler.¹⁴

2.3.1. Gen MnSOD

MnSOD disandi oleh DNA inti, namun berfungsi sebagai enzim antioksidan di mitokondria. Setelah sintesis, MnSOD ditranspor ke dalam matriks mitokondria. Sebagian besar mitokondria mengkonsumsi lebih dari 95% oksigen sel, sehingga rantai transpor elektron mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) endogen. Sehubungan dengan tersebut, adanya MnSOD yang terletak di dalam matriks mitokondria merupakan komponen yang paling penting untuk melakukan perlindungan pertama terhadap toksisitas ROS tersebut.^{9,14}

Promotor gen MnSOD tikus hampir sama dengan manusia, yaitu sedikit mengandung kotak TATA dan CAAT, namun kaya akan G dan C (84% pada 200 bp pertama). Pada promotor gen MnSOD tikus ini mengandung situs SP-1 (*promoter-selective transcription factor*), situs AP-1 (*activator protein*) serta situs *nuclear factor-κB* (NF-κB).³¹

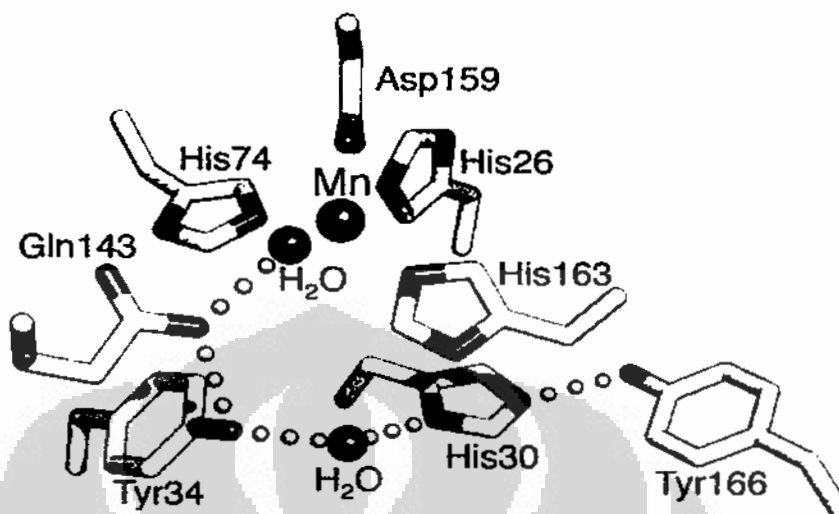
Pada manusia telah dilaporkan adanya polimorfisme genetik MnSOD, yaitu Ala16Val dan Ile58Thr. Pada polimorfisme Ala16Val terjadi substitusi Alanin (GCT) menjadi Valin (GTT) pada posisi 16 *mitochondrial targeting sequence* (MTS) dari MnSOD manusia sehingga menyebabkan transpor MnSOD ke dalam matriks

mitokondria menjadi terganggu. Sutton et al. melaporkan bahwa Ala-MnSOD 30-40% lebih aktif di dalam matriks mitokondria dibandingkan dengan Val-MnSOD.³² Polimorfisme lain, yaitu Ile58Thr pada ekson 3, dapat mempengaruhi stabilitas MnSOD sehingga mengurangi jumlah dan aktivitas enzim.³³

2.3.2. Protein MnSOD

Struktur MnSOD merupakan homotetramer (terdiri dari 4 subunit yang sama) dengan berat molekul relatif 88.000 Da. Monomernya melipat membentuk dua domain. Domain N-terminal terdiri dari dua α heliks yang antiparalel. Domain C-terminal terdiri dari lembar β yang dibentuk dari 3 lembar β antiparalel yang dikelilingi 4-6 α heliks. Ion mangan diikat oleh dua residu dari domain N-terminal dan dua residu dari domain C-terminal. Situs aktif pada tiap subunit terdapat pada perbatasan antara struktur heliks dan domain α/β . Situs aktifnya terdiri dari empat asam amino yaitu His26, His74, Asp159 dan His163. Keempat asam amino ini dikoordinasi oleh ion mangan, membentuk struktur geometri segitiga bipiramidal (gambar 2.5).³⁴

Pada situs aktif enzim ini juga terdapat ikatan hidrogen antara beberapa asam amino dengan air. Ikatan hidrogen ini diduga membantu transfer proton ke situs katalitik dalam proses katalisis. Ikatan hidrogen ini dimulai dari ion mangan yang berikatan dengan air, lalu berikatan dengan Gln143 - Tyr34 - His30 - Tyr166. Perubahan salah satu dari asam amino tersebut mempengaruhi pada aktivitas katalitik dan stabilitasnya. Substitusi pada Gln143 menyebabkan penurunan aktivitas enzimatik 2-3 kali dibanding normal.³⁵ Mutasi Tyr34Phe menurunkan kecepatan enzimatknya 10 kali dibanding normal.^{36,37}



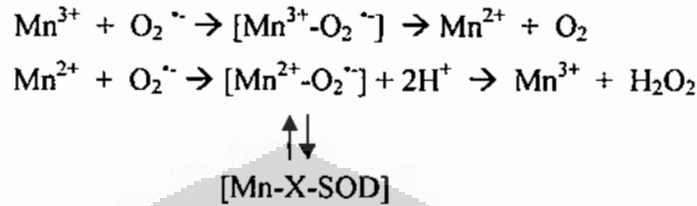
Gambar 2.5. Situs aktif MnSOD.³⁴

Ion mangan pada situs aktif MnSOD berada dalam bentuk Mn (III). Penghilangan ion Mn pada situs aktifnya dapat menghilangkan aktivitas katalitiknya, dan ion Mn ini tidak dapat digantikan dengan ion logam lain. Sekuens asam amino MnSOD ini mirip untuk tiap hewan, tumbuhan dan bakteri. Enzim ini mudah rusak karena pemanasan dan perlakuan dengan pelarut organik atau detergen, berbeda dengan CuZnSOD yang lebih stabil.⁹

Jumlah relatif MnSOD dan CuZnSOD pada hewan tergantung pada jaringan dan spesiesnya, tolok ukur yang paling menonjol adalah jumlah dari mitokondria yang terdapat di masing-masing jaringan. Pada eritrosit mamalia tidak terdapat MnSOD, karena tidak mempunyai mitokondria, sedangkan pada jaringan hati aktivitas MnSODnya 10% dari aktivitas SOD total. Akan tetapi jika suplai *copper* terbatas, maka sintesis MnSOD ditingkatkan untuk mempertahankan aktivitas SOD total. Diet juga dapat mempengaruhi pembentukan isoform SOD ini. Pada ayam yang diberi makanan dengan Mn terbatas, maka pembentukan MnSOD menjadi berkurang dan dikompensasi dengan pembentukan CuZnSOD yang meningkat.^{9,14}

2.3.3. Aktivitas MnSOD

MnSOD menetralkan anion superoksida yang sangat reaktif melalui dua langkah reaksi dismutase. Pada proses ini, Mn^{3+} direduksi dan kemudian dioksidasi:



Bentuk intermediet pada reaksi kedua berada dalam keadaan stabil dengan bentuk kurang aktif, dimana $O_2^{\cdot-}$ terikat dalam kondisi non produktif. Pada pH 7,0 kecepatan reaksi dismutasi $O_2^{\cdot-}$ untuk Cu/ZnSOD dan MnSOD sama. Namun pada MnSOD kecepataannya akan menurun pada pH alkali (contoh MnSOD E.coli kecepatan reaksi pada pH 7,8 adalah $1,8 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$, tetapi pada pH 10,2 adalah $0,33 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$).⁹

Penurunan kadar MnSOD, sebagai satu-satunya *scavenger* $O_2^{\cdot-}$, dapat menyebabkan peningkatan kadar ROS dalam mitokondria sehingga terjadi stres oksidatif yang menginduksi kerusakan oksidatif berbagai molekul dalam sel seperti protein, karbohidrat, lemak dan DNA.^{9,14}

Banyak studi yang telah meneliti mengenai pentingnya peran MnSOD ini. Mencit dengan *knockout* gen MnSOD akan mati beberapa hari setelah lahir karena mengalami stres oksidatif yang masif. Mencit tersebut akan mengalami kelainan jantung, akumulasi lemak di hati dan otot skelet serta terjadi asidosis metabolik, biasanya akan mati pada hari kesepuluh setelah lahir.³⁸ Pada mencit heterozigot SOD2 (+/-) pada awal kehidupannya terlihat normal, namun semakin bertambah umurnya akan terlihat peningkatan kerusakan oksidatif yang ditandai dengan adanya kerusakan DNA dan peningkatan terjadinya kanker.³⁹

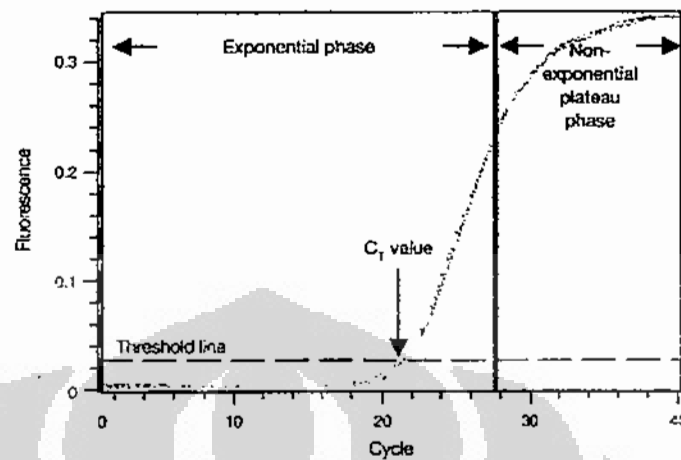
Suatu penelitian melaporkan bahwa peningkatan aktivitas MnSOD melalui aktivasi STAT3 (*signal transducer and activator transcription 3*) dapat melindungi kardiomyosit dari kerusakan oksidatif akibat hipoksia-reoksigenasi.⁴⁰ Penelitian lain juga melaporkan bahwa penetralan radikal bebas oleh SOD dapat mengurangi kerusakan jaringan pada iskemia otak.⁴¹

2.4. *Real Time PCR*

Perbedaan *real time PCR* dengan PCR konvensional, yaitu produk yang teramplifikasi (amplikon) pada PCR konvensional dideteksi setelah proses PCR berakhir yaitu dengan menjalankan DNA pada gel agarosa. Sedangkan pada *real time PCR*, amplikonnya dapat dideteksi saat reaksi berlangsung, oleh karena itu disebut sebagai *real time*. Pendeteksian produk *real time PCR* disebabkan karena adanya zat fluoresens yang menunjukkan adanya peningkatan jumlah DNA yang sejalan dengan peningkatan sinyal fluoresens. Senyawa fluoresens ini berperan sebagai pewarna yang berikatan pada DNA serta label pada sekuens primer atau probe. Mesin *real time PCR (thermal cyclers)* dilengkapi perangkat yang dapat memonitor fluoresensi sebagai tanda terjadinya amplifikasi. Peningkatan fluoresensi menunjukkan jumlah dari produk yang teramplifikasi pada tiap siklus.⁴²

Keuntungan *real time PCR* dibandingkan PCR konvensional adalah pada *real time PCR* dapat ditentukan jumlah cDNA yang telah diamplifikasi dengan akurasi dan sensitivitas yang tinggi. Hasil *real time PCR* dapat bersifat kualitatif (ada atau tidak dari suatu sekuens) atau kuantitatif (jumlah cDNA). Selain itu data hasil *real time PCR* dapat langsung dievaluasi tanpa harus dilakukan elektroforesis dan manipulasi post amplifikasi dapat dihilangkan.⁴²

Jumlah siklus PCR diperlihatkan pada x-axis dan fluoresensi dari reaksi amplifikasi (sejalan dengan jumlah produk yang teramplifikasi) diperlihatkan pada y-axis. Grafik amplifikasi dibagi menjadi 2 fase yaitu fase eksponensial yang diikuti oleh fase non eksponensial (*plateau*), seperti terlihat pada gambar 2.6. Selama fase eksponensial, jumlah produk PCR kira-kira dua kali lipat dalam setiap siklus. Selama reaksi berlangsung, komponen-komponen reaksi dikonsumsi sehingga satu atau lebih komponennya menjadi terbatas. Pada saat tersebut, reaksi berjalan lambat dan memasuki fase *plateu* (siklus 28 – 40).⁴²



Gambar 2.6. Kurva fluoresens pada *real time* PCR.⁴²

Pada awalnya, fluoresens belum terdeteksi (siklus 1-18, gambar 2.9) karena masih berada di bawah ambang batas (*threshold line*), kemudian produk terakumulasi secara eksponensial. Apabila produk yang terakumulasi tersebut berada dalam jumlah yang cukup, maka sinyal fluoresensi akan terdeteksi. Jumlah siklus dimana sinyal fluoresens dapat terdeteksi disebut sebagai *Cycle threshold* atau Ct. Nilai Ct dari suatu reaksi terutama ditentukan oleh jumlah *template* DNA/RNA pada awal reaksi amplifikasi. Apabila terdapat *template* dalam jumlah besar pada awal reaksi, maka siklus amplifikasi yang diperlukan relatif sedikit untuk memperoleh akumulasi produk yang cukup memberikan sinyal fluoresens di atas ambang batas, sehingga reaksi tersebut akan mempunyai nilai Ct yang rendah. Namun sebaliknya, apabila jumlah *template* kecil pada awal reaksi, maka siklus amplifikasi yang diperlukan lebih banyak sehingga reaksi tersebut akan mempunyai nilai Ct yang tinggi.⁴²

Analisis kuantitatif dengan *real time* PCR tersebut memerlukan kondisi reaksi yang optimal. *Real time* kuantitatif berjalan optimal antara lain ditandai dengan kurva standar yang linier ($R^2 > 0,980$ atau $r > 1-0,990$) serta efisiensi amplifikasi yang tinggi (90-110 %).⁴² Langkah penting dalam menggunakan *real time* PCR adalah pemilihan bahan kimia fluoresens yang akan digunakan. Bahan kimia fluoresensi dapat dikelompokkan menjadi 2 tipe utama yaitu :

1. Fluoresens yang mengikat DNA (*DNA-binding dyes*) seperti SYBR Green I
2. Fluoresens yang dilabelkan pada primer yang spesifik atau sebagai petanda (*dye-labeled*) seperti *molecular beacons & Taqman*, hidridisasi dan petanda *Eclipse, Amplifluor, Scorpions, LUX* dan primer *BD QZyme*).

Bahan kimia fluoresensi yang paling umum dipakai adalah fluoresensi yang mengikat DNA SYBR Green I dan petanda hidrolisis TaqMan. SYBR Green I akan berikatan secara tidak spesifik dengan DNA untai ganda (*double-stranded DNA/dsDNA*). SYBR Green I memperlihatkan fluoresens yang kecil ketika berada dalam bentuk bebas dalam larutan, tetapi intensitas fluoresens meningkat sampai 1000 kali ketika berikatan dengan DNA. Dengan demikian sinyal fluoresens dari suatu reaksi *real time* PCR sebanding dengan jumlah dsDNA yang ada, dan sinyal tersebut akan semakin meningkat ketika terjadi amplifikasi target.⁴²

Metode analisis hasil *real time* PCR dapat secara perhitungan mutlak (*absolute quantification*) maupun secara perhitungan relatif (*relative quantification*). Perhitungan mutlak diperoleh dengan membandingkan nilai Ct sampel uji terhadap kurva standar. Hasil analisis berupa jumlah asam nukleat (*copy number*, μg) per sel atau per μg RNA total. Pada perhitungan relatif, hasil analisis merupakan suatu rasio untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi relatif suatu gen target pada sel yang normal dibandingkan dengan yang terkena suatu penyakit (uji). Baik metode perhitungan mutlak maupun perhitungan relatif harus dinormalisasi sehingga data yang diperoleh menjadi bermakna. Hal ini dilakukan dengan menggunakan *normalizers* yaitu *housekeeping/reference gene*, yang merupakan gen dengan ekspresi yang konstan pada semua sampel, di mana ekspresinya tidak dipengaruhi oleh perlakuan.

Analisis perhitungan relatif dapat menggunakan metode Livak atau metode Pffaf. Metode Livak digunakan apabila gen target maupun gen referens memiliki efisiensi yang mendekati 100 % dan berjarak 5 % antara satu dengan yang lain. Sedangkan metode Pffaf digunakan apabila efisiensi amplifikasi antara gen target dan gen referensi tidak sama.⁴²

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba. Hewan coba yang akan digunakan adalah tikus jantan strain Sprague Dawley.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung selama 10 bulan, mulai bulan Agustus 2007 sampai bulan Mei 2008.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 25 ekor tikus jantan strain Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L*), berumur 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus diperoleh dari Unit Gizi Diponegoro Litbang Depkes RI.

Dari 25 tikus ini dibagi menjadi 5 kelompok:

- I. kelompok tikus tanpa perlakuan (hipoksia 0 hari) sebagai kontrol
- II. kelompok tikus dengan hipoksia selama 1 hari
- III. kelompok tikus dengan hipoksia selama 7 hari
- IV. kelompok tikus dengan hipoksia selama 14 hari
- V. kelompok tikus dengan hipoksia selama 21 hari

3.4. Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer:

$$\begin{aligned} \{(t-1)(n-1)\} &\geq 1 & t &= \text{jumlah kelompok perlakuan} = 5 \\ \{(5-1)(n-1)\} &\geq 15 & n &= \text{jumlah sampel pada masing-masing kelompok} \\ n &\geq 5 & & \text{perlakuan} \end{aligned}$$

Jadi masing-masing kelompok terdiri dari 5 tikus. Jumlah sampel total adalah 25 tikus.

3.5. Bahan dan Alat Penelitian

3.5.1. Bahan Penelitian

- Gas campuran khusus dalam tangki gas yang mengandung 10% oksigen dan 90% nitrogen.
- Reagensia untuk isolasi RNA total: Aquapure RNA Isolation Kit (Cat # 732-6370-BioRad, Hercules, CA-USA).
- Primer untuk gen MnSOD dan beta actin tikus Sprague Dawley.
- Real Time Quantitative RT-PCR System dengan iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green (cat # 170-8892-BioRad, Hercules, CA-USA).
- Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas MnSOD: kit RANSOD[®].

3.5.2. Alat Penelitian

- Kandang hipoksia (*Hypoxic Chamber*) dua set: ukuran besar dan kecil, masing-masing dengan kapasitas enam dan empat ekor tikus.
- Digital oxygen meter (OX-12B, No. 05213, MIEI Shanghai, China).
- Alat bedah tikus (minor set).
- Timbangan digital (Sartorius).
- *Ultra-low temperature freezer* -80° C (MDF-U3286S, Sanyo).
- Homogenizer (Wheaton Science, Millville, NJ-USA).
- Quantitative Real-Time RT-PCR, Mini Opticon, BioRad Laboratories-USA.
- Spektrofotometer UV-Vis, BioRad Laboratories-USA.
- Sentrifus, vorteks, water bath.
- Tabung mikro, spuit, mikropestel.
- Tabung *real time PCR*.
- Mikropipet dan tips.

3.6. Cara Kerja

3.6.1. Persiapan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel

3.6.1.1. Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus strain Sprague Dawley dibeli dari Unit Gizi Dipenegoro, Puslitbang Depkes RI sebanyak 25 ekor, berumur 6-8 minggu, dengan berat 150-200 gram. Sebelum perlakuan hipoksia, tikus diadaptasikan dengan lingkungan *animal house* Biokimia selama 1 hari. Diberikan makanan dan minuman *ad libitum*, suhu ruang sekitar 25°C, serta pengaturan siklus cahaya terang-gelap selama 12 jam-12 jam.

3.6.1.2. Perlakuan Tikus Menjadi Hipoksia

Kelompok tikus hipoksia dimasukkan ke dalam kandang tertutup (*hypoxic chamber*, gambar 3.1) berukuran 60x50x40cm yang diberi suplai oksigen sebesar 10%, tikus yang masuk maksimum 6 ekor. Diberikan oksigen 10% karena untuk membuat kondisi hipoksia yang masih bisa ditoleransi oleh tikus, sesuai dengan metode penelitian yang sudah dilakukan oleh peneliti lain.⁴³

Selama perlakuan hipoksia, tikus diberi makanan dan minuman *ad libitum*, suhu ruang sekitar 25°C, serta pengaturan siklus cahaya terang-gelap selama 12 jam-12 jam. Kandang dibersihkan setiap 2 hari sekali.

Perlakuan hipoksia tersebut dilakukan selama 1 hari untuk kelompok II, 7 hari untuk kelompok III dan 14 hari untuk kelompok IV dan 21 hari untuk kelompok V. Untuk tikus kontrol tidak diberi perlakuan apa-apa, dipelihara dalam kondisi normal.

3.6.1.3. Pengambilan Jaringan Jantung, Otak dan Darah Tikus

Tikus dimatikan dengan eter, kemudian dibedah hingga terlihat jantungnya. Setelah itu darah diambil dari jantung dengan spuit untuk isolasi RNA total dan pemeriksaan aktivitas MnSOD. Organ jantung dan otak tikus diambil, kemudian disimpan dalam *ultra-low temperature freezer* -80°C.



Gambar 3.1. Kandang untuk induksi hipoksia (*hypoxic chamber*)

3.6.2. Isolasi RNA Total dari Jaringan Jantung, Otak dan Darah

Ekstraksi RNA total dari berbagai jaringan tersebut dengan menggunakan *Aquapure RNA Isolation Kit* (BioRad)

Tahap isolasi RNA total sebagai berikut :

Lisis Sel

Jaringan ditimbang sebanyak 5-10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL yang berisi 300 μ l *RNA Lysis Solution*. Jaringan tersebut dilumatkan dengan menggunakan Homogenizer. Untuk sampel darah, sebanyak 300 μ l darah dalam tabung 1,5 mL ditambahkan dengan 900 μ l *RBC Lysis Solution* untuk melisis sel darah merah. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, sambil sesekali dibolak-balik. Setelah itu disentrifugasi 13.000-16.000 x g selama 20 detik. Supernatan dibuang, pellet putih serta supernatan sebanyak 10-20 μ l ditinggalkan. Kemudian pellet divorteks untuk meresuspensi pellet sel darah putih. Kemudian sebanyak 300 μ l *RNA Lysis Solution* ditambahkan ke dalam resuspensi

tersebut, lalu dengan menggunakan pipet (dihisap lalu dikeluarkan) sel darah putih dilisiskan.

Presipitasi Protein-DNA

Sebanyak 100 μ l larutan presipitasi DNA – Protein ditambahkan ke dalam homogenat. Lalu tabung dibolak-balikkan sebanyak 10 kali dan kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Setelah itu disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 13.000 – 16.000 x g. Protein dan DNA yang terpresipitasi terlihat sebagai pellet putih.

Presipitasi RNA

Supernatan yang berisi RNA dituang ke dalam tabung 1,5 mL baru yang berisi 300 μ l isopropanol 100 %. Kemudian tabung dibolak-balikkan sebanyak 25 – 30 kali, setelah itu disentrifugasi pada 13.000 – 16.000 x g selama 3 menit. RNA terlihat sebagai pellet kecil yang translusen. Supernatan dibuang dan tabung dikeringkan di atas kertas saring. Lalu sebanyak 300 μ l etanol 70 % ditambahkan ke pellet dan tabung dibolak-balikkan beberapa kali untuk mencuci pellet RNA. Kemudian disentrifugasi pada 13.000 – 16.000 x g selama 1 menit, setelah itu etanol dibuang dengan hati-hati. Tabung dibiarkan mengering dengan membalikkan di atas kertas saring selama 10 -15 menit.

Hidrasi RNA

Pellet RNA dilarutkan dalam 50 μ l larutan hidrasi RNA. Larutan diinkubasi dalam es paling tidak selama 30 menit untuk merehidrasi RNA. Alternatif lain, sampel RNA disimpan pada suhu -70° sampai -80°C sampai digunakan kemudian.

3.6.3. Desain Primer

Primer MnSOD dan beta actin (sebagai gen referensi) didesain dengan menggunakan program *Pimer3* dan *Primer Analysis*. Desain primer ini menggunakan data gene bank: NM_017051 untuk gen MnSOD dan NM_031144 untuk gen beta

actin. Primer MnSOD yang digunakan yaitu 5'- AAC GTC ACC GAG GAG AAG TA -3' untuk *forward* serta 5'- TGA TAG CCT CCA GC A ACT CT -3 untuk *reverse* dengan menghasilkan produk PCR sebesar 178 bp. Primer beta actin yang digunakan yaitu 5'- CAC TGG CAT TGT GAT GGA CT -3' untuk *forward* dan 5'- CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA -3' untuk *reverse*, yang akan menghasilkan produk PCR sebesar 174 bp.

3.6.4. Amplifikasi cDNA MnSOD

Amplifikasi cDNA dengan alat *real time* PCR (MiniOpticon, BioRad) menggunakan *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green* (BioRad). Cara kerja *real time* PCR sama dengan PCR biasa, perbedaannya yaitu dengan menggunakan *real time* PCR produk yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur pada saat reaksi sedang berlangsung, oleh karena itu disebut "*real time*". Produk PCR ini dapat dideteksi dengan menambahkan molekul fluoresens pada campuran reagen PCR, salah satunya yaitu *SYBR Green*. Peningkatan jumlah DNA yang terbentuk sebanding dengan peningkatan sinyal fluoresens. *SYBR Green* merupakan senyawa yang sedikit berfluoresens dalam keadaan bebas pada larutan, namun fluoresens akan meningkat 1000 kali bila berikatan dengan DNA untai ganda. *SYBR Green* berikatan secara non spesifik pada DNA untai ganda.

Reagen yang digunakan untuk *real time* RT PCR adalah *SYBR Green*, enzim reverse transkriptase, primer, template RNA (dipakai ~ 300 ng untuk semua jaringan) dan *nuclease free water*.

Protokol reaksi dengan *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green* (BioRad) adalah sbb :

1. Sintesis cDNA selama 10 menit pada suhu 50°C
2. Inaktivasi *iScript Reverse transcriptase* selama 5 menit pada suhu 95°C
3. Siklus PCR (30 – 45 siklus) selama 10 detik pada suhu 95°C; 30 detik pada suhu 60°C (setelah optimalisasi); 30 detik pada suhu 72°C.
4. Analisis *Melt curve* selama 1 menit pada suhu 95°C; 1 menit pada suhu 55°C; 10 detik pada suhu 55°C (80 siklus, meningkat 0,5°C setiap siklus).

Dengan Real Time PCR dapat ditentukan jumlah salinan cDNA hasil amplifikasi yang menggambarkan ekspresi gen MnSOD secara kuantitatif. Gen β actin digunakan sebagai standar eksternal. Amplifikasi gen β actin dilakukan dengan kondisi yang sama dengan gen MnSOD. Sebagai kontrol negatif digunakan aquabidest sebagai pengganti RNA untuk menyingkirkan hasil positif palsu. Dengan Real Time PCR diperoleh nilai efisiensi dan C(t).

Analisis ekspresi gen dinilai secara *relative quantification* dengan menggunakan metode Pfaffl dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

E target = Efisiensi gen MnSOD pada jaringan tikus hipoksia

E ref = Efisiensi gen β actin pada jaringan tikus hipoksia

ΔC_T target = [C(t) calibrator gen MnSOD] – [C(t) test gen MnSOD]

ΔC_T Ref = [C(t) calibrator gen β actin] – [C(t) test gen β actin]

3.6.5. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

Pembuatan Homogenat Jaringan dan Lisat Darah

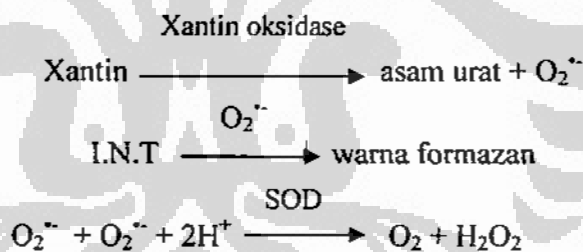
Untuk pengukuran aktivitas MnSOD dari jaringan digunakan homogenat jaringan. Jaringan ditimbang sebanyak 100 mg jaringan, kemudian buat homogenat dalam 1 ml buffer fosfat 0,01 M pH 7.0. Sentrifugasi homogenat tersebut pada 5000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan dituang ke dalam tabung yang bersih. Supernatan tersebut digunakan untuk pemeriksaan aktivitas MnSOD.

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD dari darah diambil dari sel lekosit. Sebanyak 200 μ l darah (*whole blood*) ditambahkan 600 μ l larutan pelisis sel darah merah, kemudian didiamkan selama 10 menit. Lalu disentrifugasi selama 20 detik pada kecepatan 16000 rpm, sehingga terjadi pemisahan sel lekosit dengan sel-sel darah merah serta tampak sel lekosit sebagai pellet putih. Kemudian supernatan (sel darah merah yang lisis) dibuang, sekitar 10 μ l supernatan disisakan. Sel-sel lekosit (pellet putih) dilisiskan dengan larutan pelisis sel lekosit sebanyak 200 μ l. Lisat sel

lekosit diencerkan lagi 5 x dengan buffer fosfat sehingga total pengenceran menjadi 100 x. Lisat sel leukosit yang telah diencerkan tersebut digunakan untuk pemeriksaan aktivitas MnSOD.

Pengukuran Aktivitas MnSOD

Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia yaitu dengan menggunakan kit RanSOD[®]. Prinsip pemeriksaan MnSOD dengan menggunakan kit ini adalah pengukuran besarnya inhibisi pembentukan radikal superoksida oleh MnSOD. Xantin oleh enzim xantin oksidase akan diubah menjadi asam urat dan menghasilkan radikal superoksida ($O_2^{\cdot -}$). Radikal ini akan bereaksi dengan *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride* (I.N.T) membentuk warna merah formazan. Aktivitas SOD total ditetapkan dari derajat penghambatan pembentukan warna formazan ini yang diukur dengan spektrofotometer A 505 nm. Untuk hasil aktivitas MnSOD yang diukur, maka ditambahkan NaCN ke dalam reaksi tersebut untuk menghambat aktivitas CuZnSOD.



Reagen-reagen pada kit ini terdiri dari *mixed substrate* yang mengandung xantin, buffer fosfat, xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar. Sebanyak 25 μ l sampel/standar dimasukkan ke dalam kuvet, lalu ditambahkan *mixed substrate* dan campur dengan baik. Untuk menghambat Cu/ZnSOD, sebanyak 5 μ l natrium sianida 5mM ditambahkan ke dalam campuran tersebut dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan enzim xantin oksidase dan serapan cahaya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detik pertama setelah penambahan enzim (A1) dan 3 menit kemudian (A2), (tabel 1).

Tabel 1. Komposisi reagen untuk pengukuran aktivitas MnSOD dengan kit RanSOD

Reagen	Sample Diluent (S1)	Standar S2-S6	Sampel
Sampel	-	-	25 μ l
Standar	-	25 μ l	-
Buffer fosfat	25 μ l	-	-
<i>Mixed substrate</i>	850 μ l	850 μ l	850 μ l
Campur baik-baik			
NaCN 5mM	-	-	5 μ l (inkubasi 5 menit)
Xantin oksidase	125 μ l	125 μ l	125 μ l
Baca absorbansi pada λ 505 nm 30 detik pertama dan 3 menit kemudian			

Perhitungan

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A/\text{menit (sampel maupun standar)}$$

3

Kecepatan sample diluent (S1) = kecepatan reaksi yang tidak diinhibisi = 100 %

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \left(\frac{\Delta A \text{ std/mnt} \times 100}{(\Delta A \text{ S1/mnt})} \right)$$

$$100 - \left(\frac{\Delta A \text{ sampel/mnt} \times 100}{(\Delta A \text{ S1/mnt})} \right)$$

% inhibisi sampel yang diperoleh diplot pada kurva log₁₀/semilog standar.

Pengukuran Kadar Protein

Aktivitas MnSOD pada jaringan dan darah tersebut akan dihitung per mg protein sehingga dapat dibandingkan. Kadar protein dihitung pada λ 280 nm dan dibandingkan dengan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Konsentrasi BSA yang digunakan sebagai standar yaitu 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,8 mg/ml. Sampel sel lekosit (darah) yang diukur kadar proteinnya yaitu dari 200 μ l lisat sel lekosit, hanya diambil 50 μ l sampel diencerkan dengan 950 μ l aquabidest (pengenceran 20 X). Begitu juga dengan sampel jaringan yang akan diukur kadar proteinnya, dari homogenat otak diambil 20 μ l sampel diencerkan dengan 980 μ l aquabidest

(pengenceran 50 X), sedangkan untuk homogenat jantung diambil 10 μ l sampel diencerkan dengan 990 μ l aquabidest (pengenceran 100 X).

3.7. Analisis Uji Statistik

Untuk melihat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik T test. Untuk melihat adanya hubungan yang bermakna antara pola tingkat ekspresi gen dengan aktivitas spesifik MnSOD digunakan uji korelasi Pearson.



BAB IV HASIL DAN DISKUSI

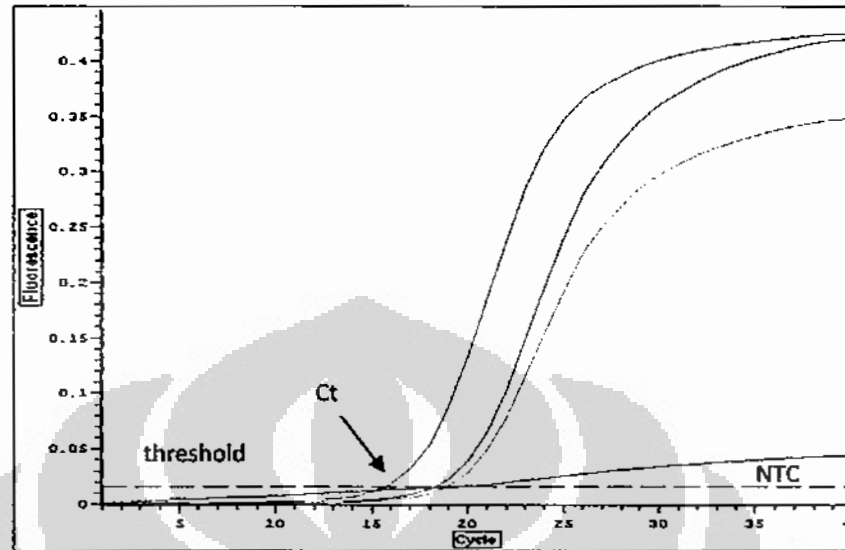
4.1. Induksi hipoksia sistemik pada tikus

Induksi hipoksia sistemik dilakukan dengan memasukkan tikus ke dalam kandang tertutup (*hypoxic chamber*) yang diberikan gas campuran $O_2:N_2=10\%:90\%$. Prosedur ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan RI dengan nomor LB.03.02/KE/1347/2008. Dari hasil analisis gas darah didapatkan terjadi penurunan pO_2 dan pCO_2 , serta peningkatan hemoglobin dan hematokrit darah yang menandakan bertambahnya jumlah sel darah merah.⁴⁴ Hal ini merupakan mekanisme kompensasi dari kondisi hipoksia yang dipaparkan agar suplai oksigen ke jaringan dapat dipertahankan. Selain itu juga terjadi penurunan berat badan tikus selama induksi hipoksia sistemik.

4.2. Analisis ekspresi gen MnSOD dengan *Real Time* RT-PCR

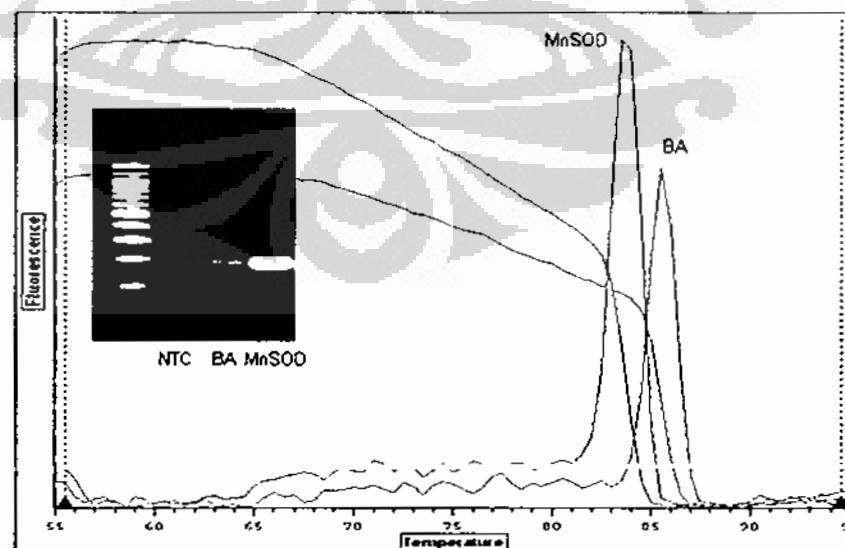
RNA total hasil ekstraksi dari darah, otak dan jantung diukur serapan cahayanya dengan sinar UV panjang gelombang 260 nm. Dari hasil pengukuran spektrofotometer didapatkan kadar RNA total yang bervariasi untuk setiap sampel. Agar hasil *real time* RT-PCR dapat dibandingkan, maka RNA total yang digunakan sebagai cetakan untuk semua jaringan dan gen perlu disamakan yaitu sebesar ~300 ng, caranya yaitu dengan mengatur volume dan pengenceran *template* RNA total yang digunakan pada campuran RT-PCR.

Hasil *real time* RT-PCR terdeteksi sebagai jumlah fluoresensi SYBR Green yang dapat diserap (gambar 4.1). Nilai *threshold* pada kurva fluoresensi diatur agar diperoleh efisiensi ekspresi yang paling optimum, namun nilai perlu diseragamkan untuk semua kurva agar pada analisis semua data dapat dibandingkan.



Gambar 4.1. Kurva fluoresensi gen MnSOD dan beta aktin serta NTC (*non template control*).

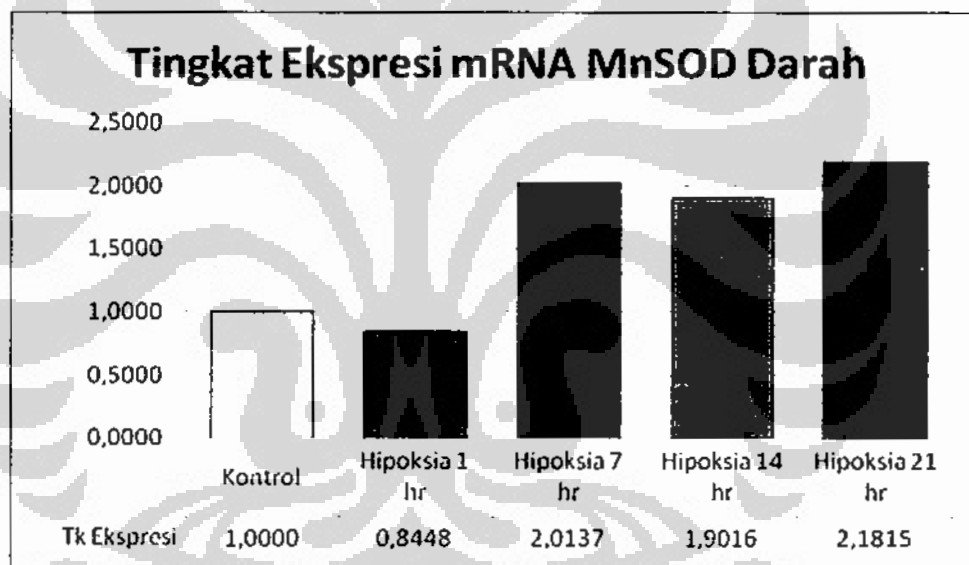
Nilai Ct ditentukan oleh alat *real time* PCR secara otomatis berdasarkan perpotongan garis kurva dengan garis *threshold*. Selain itu juga diperoleh nilai efisiensi yang digunakan untuk perhitungan tingkat ekspresi relatif. Oleh karena nilai efisiensi yang diperoleh sangat bervariasi, maka tingkat ekspresi relatif mRNA ditentukan berdasarkan rumus Pfaffl.



Gambar 4.2. *Melting curve* pada *real time* PCR.

Pada gambar tampak hanya satu puncak pada *melting curve* untuk MnSOD (83,5°C) dan beta aktin (85,5°C). Hal ini menunjukkan bahwa pasangan primer yang digunakan cukup baik dan spesifik sehingga tidak menimbulkan dimer primer. Sementara itu gambaran elektroforesis DNA juga tampak hanya satu pita dengan panjang 178 untuk gen MnSOD dan 174 untuk gen beta aktin (gambar 4.2), yang membuktikan bahwa cDNA produk amplifikasi sesuai dengan yang ditargetkan oleh pasangan primer masing-masing.

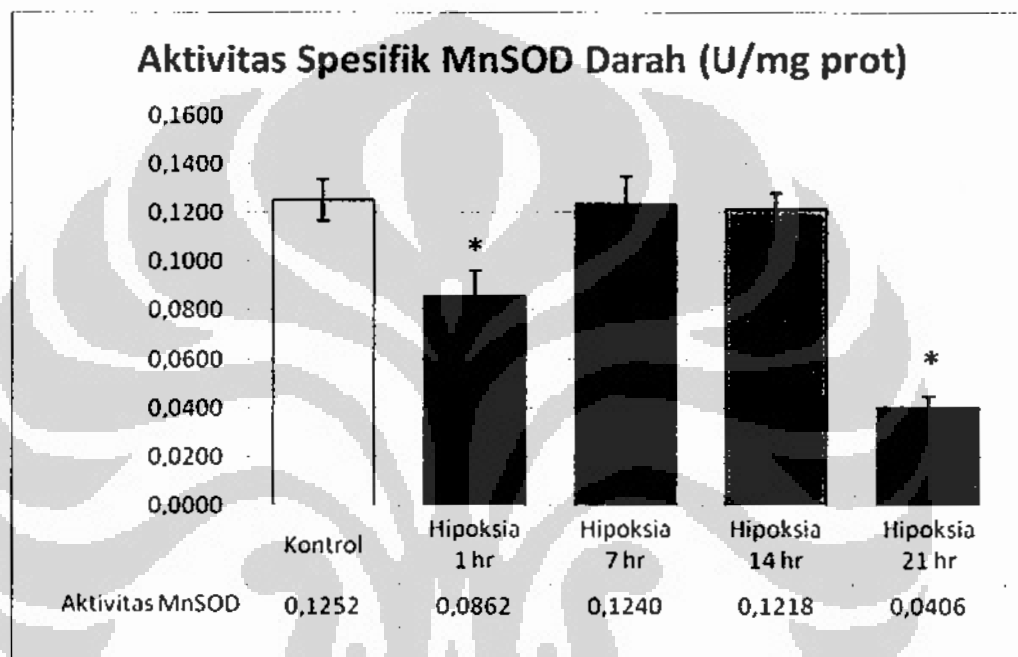
4.3. Analisis ekspresi gen MnSOD pada darah



Gambar 4.3. Diagram batang tingkat ekspresi mRNA relatif MnSOD pada darah. Kadar mRNA relatif pada kelompok tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 dan 21 hari dinormalisasi dengan kadar mRNA kelompok kontrol.

Pada gambar 4.3 menunjukkan hasil pemeriksaan tingkat ekspresi mRNA relatif MnSOD dengan menggunakan *real time* RT-PCR. Terlihat bahwa mulai terjadi peningkatan kadar relatif mRNA MnSOD (peningkatan jumlah mRNA MnSOD perlakuan dibandingkan dengan kontrol) pada darah tikus yang mengalami hipoksia 7 hari (2 kali dibandingkan dengan kontrol). Walaupun pada darah tikus hipoksia 1 hari terjadi sedikit penurunan kadar relatif mRNA MnSOD dibandingkan

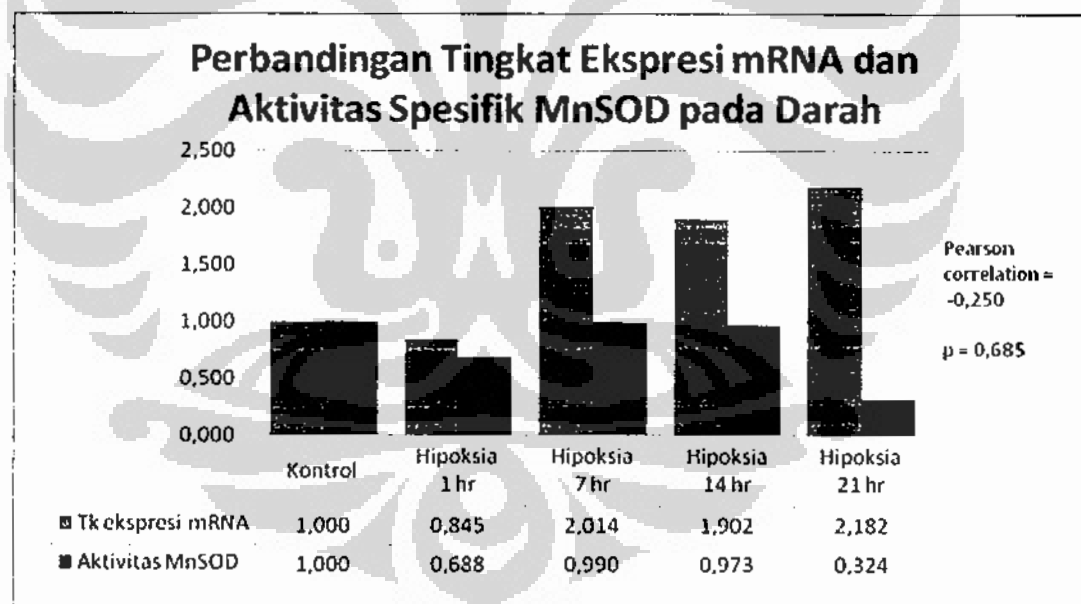
dengan kontrol. Hal ini terjadi kemungkinan karena pada hipoksia sistemik awal terjadi peningkatan produksi radikal bebas namun jumlahnya belum terlalu banyak, sehingga belum dapat menstimulasi peningkatan ekspresi mRNA MnSOD. Alasan lain mungkin terdapat perbedaan regulasi ekspresi mRNA MnSOD pada hipoksia sistemik awal dan lanjut.



Gambar 4.4. Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD (unit/mg protein) pada darah tikus yang diinduksi hipoksia 0, 1, 7, 14, dan 21 hari. (* = signifikan terhadap kontrol)

Pada pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD darah didapatkan hasil bahwa pada darah tikus yang mengalami hipoksia 1 hari terjadi penurunan secara signifikan dibandingkan dengan kontrol ($p = 0,019$). Kemudian terjadi peningkatan aktivitas spesifik MnSOD pada darah tikus yang hipoksia 7 hari dibanding dengan darah tikus hipoksia 1 hari secara bermakna ($p = 0,039$), walaupun bila dibandingkan dengan kontrol tidak bermakna. Pada darah tikus yang mengalami hipoksia 21 hari terjadi penurunan kembali aktivitas spesifik MnSOD secara bermakna dibandingkan baik dengan darah tikus kontrol ($p = 0,000$) maupun dengan hipoksia 14 hari ($p = 0,000$) (gambar 4.4).

Pola nilai aktivitas spesifik MnSOD ini hampir mirip dengan pola tingkat ekspresi mRNA-nya. Perbedaannya pada hipoksia 21 hari, aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia ini menurun. Hal ini mungkin disebabkan karena peningkatan produksi ROS yang masif pada hipoksia lanjut, sehingga kemampuan enzim MnSOD dalam menetralkan ROS telah terlampaui batasnya, atau dengan kata lain enzim menjadi jenuh karena begitu banyaknya substrat (ROS) yang harus diolah. Kemungkinan lain adalah pada hipoksia lanjut mulai terjadi hambatan translasi protein, termasuk MnSOD ini. Walaupun ekspresi mRNA-nya tinggi, namun tidak semuanya ditranslasikan menjadi protein karena ATP yang berkurang. Hal ini didukung oleh penelitian Koumenis et al (2002) yang melaporkan bahwa terjadi penghambatan translasi mRNA selama hipoksia sebagai usaha untuk menjaga keseimbangan energi (mengurangi pemakaian energi), tetapi penghambatan ini bersifat reversibel.⁴⁵

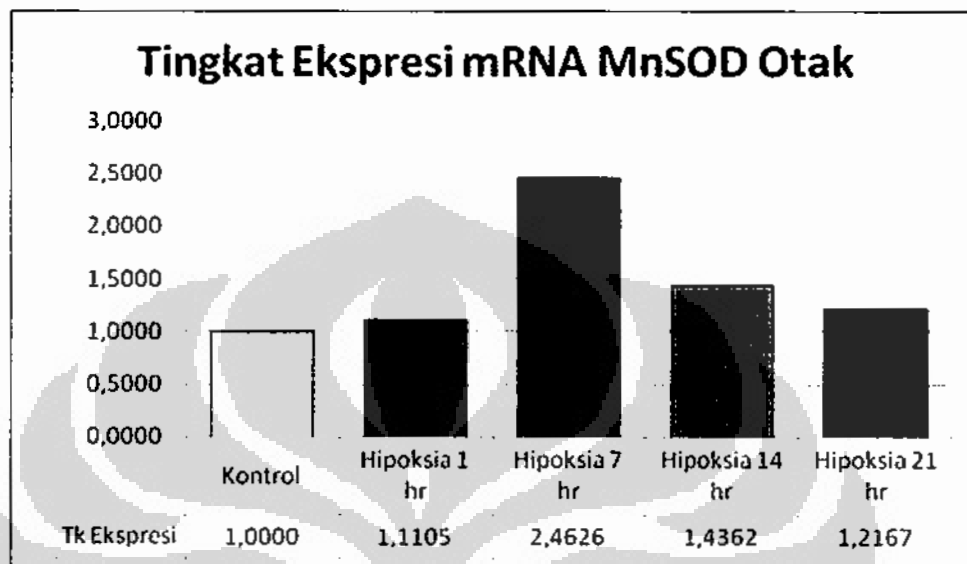


Gambar 4.5. Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD pada darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Nilai ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari dinormalisasi dengan nilai kontrol.

Hubungan antara tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD dengan aktivitas spesifik MnSOD dianalisis dengan uji korelasi Pearson (gambar 4.5). Nilai aktivitas spesifik MnSOD disini sudah dinormalisasi dengan nilai kontrol (nilai aktivitas perlakuan dibagi dengan nilai aktivitas kontrol). Hasilnya adalah pada darah tikus yang hipoksia tidak ditemukan hubungan yang bermakna antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD ($R = -0,250$). Secara garis besar pola grafik antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD hampir sama, hanya pada hipoksia 21 hari terdapat perbedaan yaitu tingkat ekspresi relatif mRNA meningkat namun aktivitas spesifik MnSOD menurun.

Namun bila dilakukan pengujian pada induksi hipoksia 0-14 hari, diperoleh hasil analisis yang menunjukkan hubungan positif sedang ($R=0,616$). Hal ini menunjukkan bahwa perubahan ekspresi relatif mRNA sejalan dengan perubahan aktivitas spesifik MnSOD pada darah yang diinduksi hipoksia sampai dengan hari ke-14. Sebaliknya pada induksi hipoksia 21 hari mulai terlihat tidak sejalan antara ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD. Hasil ini kemungkinan karena produksi ROS yang sangat masif pada hipoksia lanjut, sehingga walaupun ekspresi mRNA terus ditingkatkan namun kemampuan enzim MnSOD masih belum dapat mengatasi jumlah ROS yang sangat banyak, dengan demikian aktivitas enzim terlihat menurun.

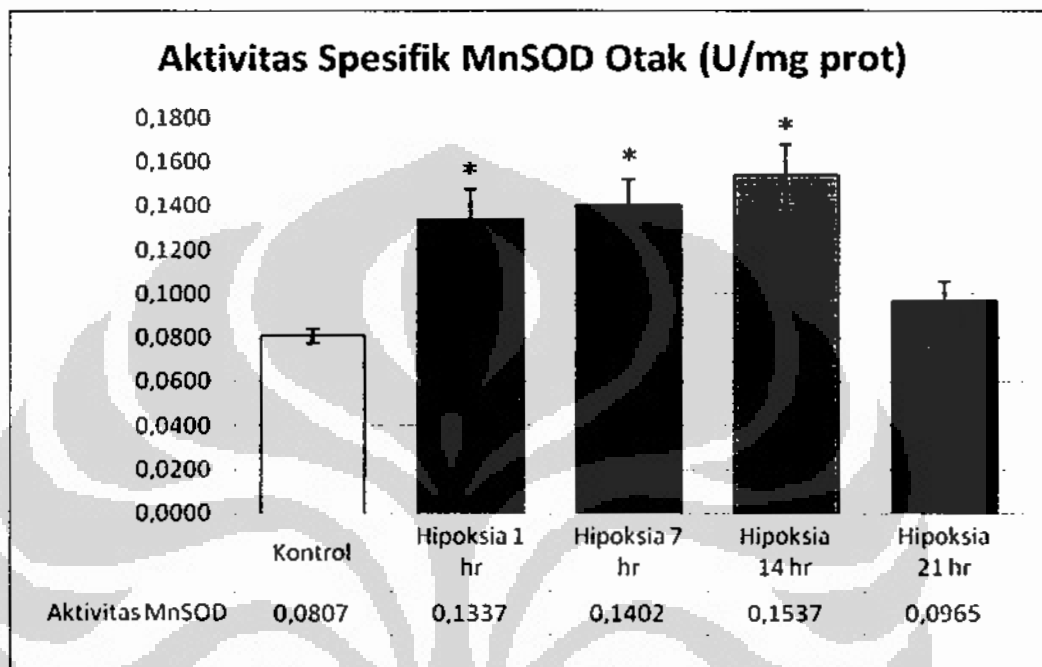
4.4. Analisis ekspresi MnSOD pada otak



Gambar 4.6. Diagram batang tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD pada otak. Kadar mRNA relatif pada kelompok tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 dan 21 hari dinormalisasi dengan kadar mRNA kelompok kontrol.

Gambar 4.6. menunjukkan diagram batang ekspresi relatif mRNA pada jaringan otak yang diinduksi hipoksia sistemik. Pada jaringan otak tikus yang hipoksia, terjadi peningkatan ekspresi relatif mRNA MnSOD pada tikus yang mengalami hipoksia 7 hari (2,5 kali dibanding kontrol). Kemudian pada tikus yang hipoksia 14 dan 21 hari terjadi penurunan kembali ekspresi relatif mRNA MnSOD. Tidak terjadinya penurunan ekspresi mRNA di awal hipoksia pada otak diduga karena jaringan otak mempunyai mekanisme autoregulasi pada keadaan rendah oksigen, yaitu pembuluh darah otak akan vasodilatasi sehingga suplai oksigen ke jaringan otak lebih besar dibandingkan jaringan lain.⁴⁶ Dengan kata lain jaringan otak cenderung tidak terlalu hipoksia dibandingkan jaringan lain. Dengan demikian ROS yang terbentuk pun tidak terlalu banyak dan sel mulai mengatasinya dengan meningkatkan ekspresi mRNA MnSOD. Dari hasil ini dapat disimpulkan otak adalah organ yang mengalami adaptasi terhadap hipoksia lebih awal dibandingkan dengan

jaringan lain. Namun pada hipoksia lanjut, ekspresi relatif mRNA MnSOD menurun namun nilainya masih di atas kontrol.

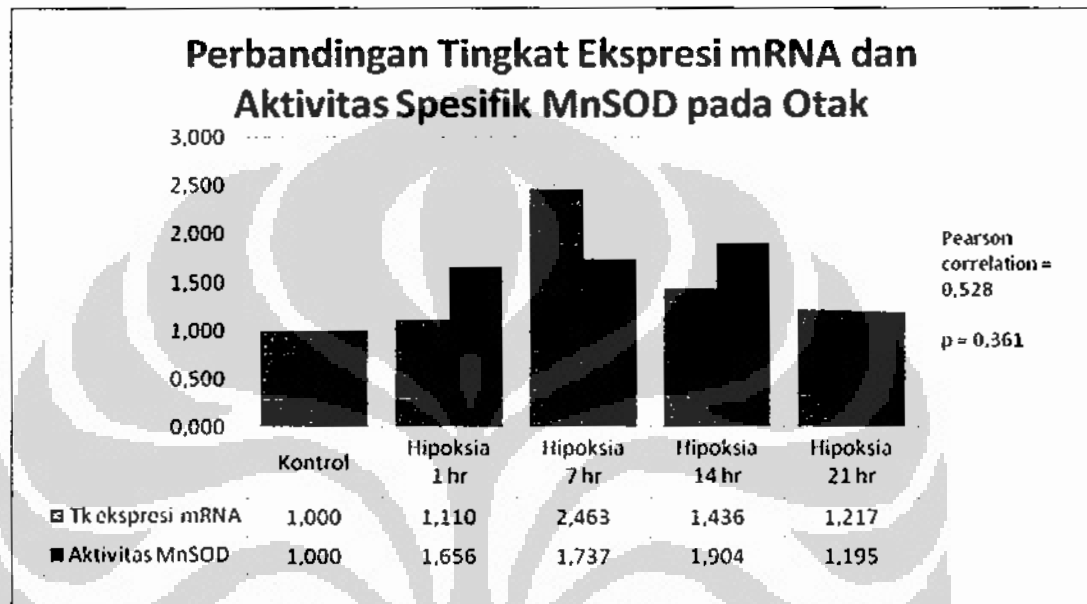


Gambar 4.7. Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD (unit/mg protein) pada otak tikus yang diinduksi hipoksia 0, 1, 7, 14, dan 21 hari. (* = signifikan terhadap kontrol)

Pada pemeriksaan aktivitas spesifik MnSOD jaringan otak tikus yang mengalami hipoksia (gambar 4.7) didapatkan hasil kecenderungan mengalami peningkatan sebanding dengan lamanya hipoksia sampai 14 hari. Peningkatan aktivitas spesifik MnSOD ini secara signifikan terjadi mulai dari otak tikus yang hipoksia 1 hari dibandingkan dengan kontrol ($p = 0,018$). Lalu meningkat terus sampai hipoksia 14 hari. Namun pada otak tikus hipoksia 21 hari, terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD secara bermakna dibandingkan dengan otak tikus hipoksia 14 hari ($p = 0,015$), yang nilainya sedikit di atas nilai kontrol.

Hasil aktivitas spesifik MnSOD ini mendukung hasil ekspresi mRNA bahwa pada awal hipoksia tidak terjadi penurunan ekspresi MnSOD. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pada otak perlindungan antioksidan dalam keadaan hipoksia

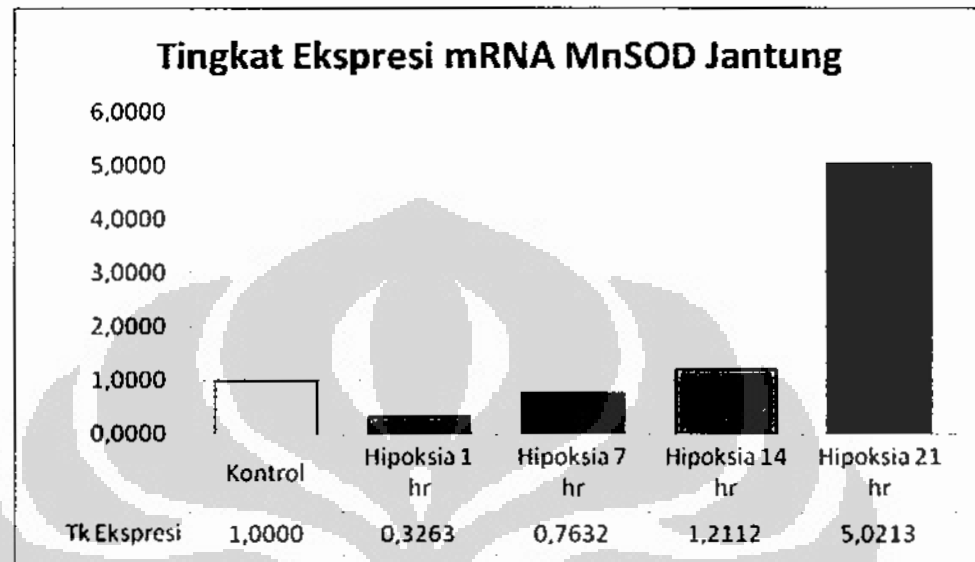
terjadi lebih awal dibandingkan jaringan lain. Pada hipoksia lanjut aktivitas spesifik MnSOD juga mengalami penurunan sama seperti ekspresi mRNA-nya. Hal ini disebabkan karena produksi ROS yang sangat masif pada hipoksia lanjut.



Gambar 4.8. Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas MnSOD pada otak tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Nilai ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari dinormalisasi dengan nilai kontrol.

Pada jaringan otak tikus yang hipoksia ditemukan adanya hubungan positif sedang antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD ($R = 0,528$). Secara garis besar pola perubahan tingkat ekspresi mRNA dengan aktivitas MnSOD sesuai, hanya terdapat pada perbedaan pada puncaknya. Pada tingkat ekspresi mRNA puncak tertinggi pada hipoksia 7 hari, sedangkan pada aktivitas MnSOD puncak tertingginya pada hipoksia 14 hari (gambar 4.8). Penurunan ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia lanjut (21 hari) disebabkan karena produksi ROS yang sangat banyak. Namun jumlah ROS yang banyak ini masih dapat diatasi oleh aktivitas enzim MnSOD yang tersedia tanpa harus meningkatkan ekspresi mRNA MnSOD.

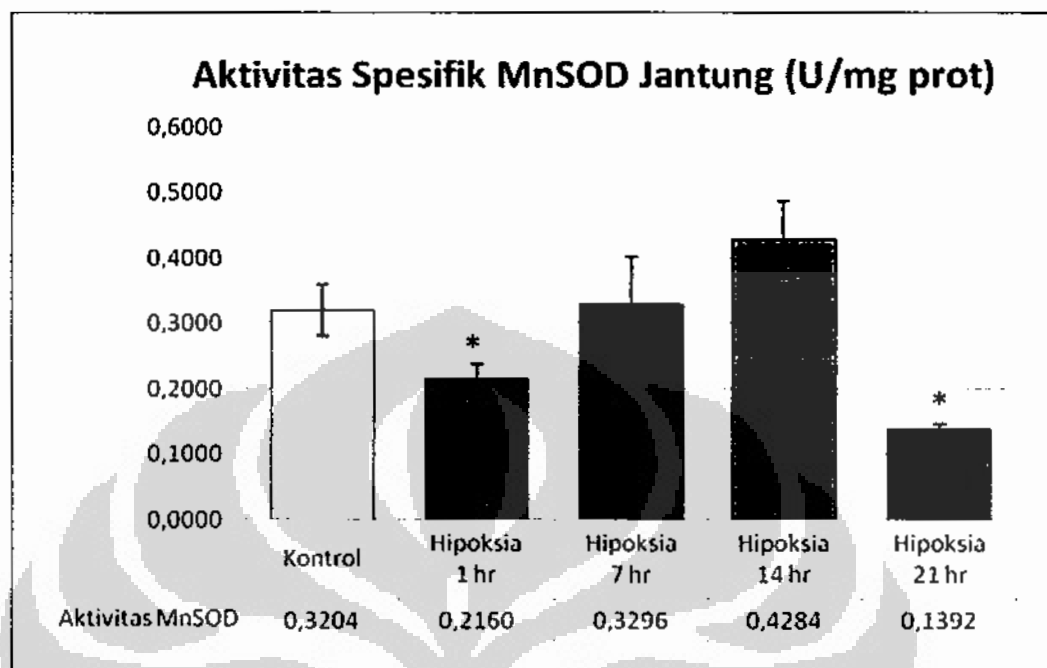
4.5. Analisis ekspresi MnSOD pada jantung



Gambar 4.9. Diagram batang tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD pada jantung. Kadar mRNA relatif pada kelompok tikus yang diinduksi hipoksia 1, 7, 14 dan 21 hari dinormalisasi dengan kadar mRNA kelompok kontrol.

Pada jaringan jantung tikus yang mengalami hipoksia 1 hari terjadi penurunan ekspresi relatif mRNA MnSOD (1/3 kali dibanding kontrol). Kemudian ekspresi ini akan meningkat sesuai dengan lamanya hipoksia. Namun peningkatan ekspresi mRNA MnSOD yang sangat mencolok terjadi pada jantung tikus yang hipoksia 21 hari (5 kali dibanding kontrol) (gambar 4.9).

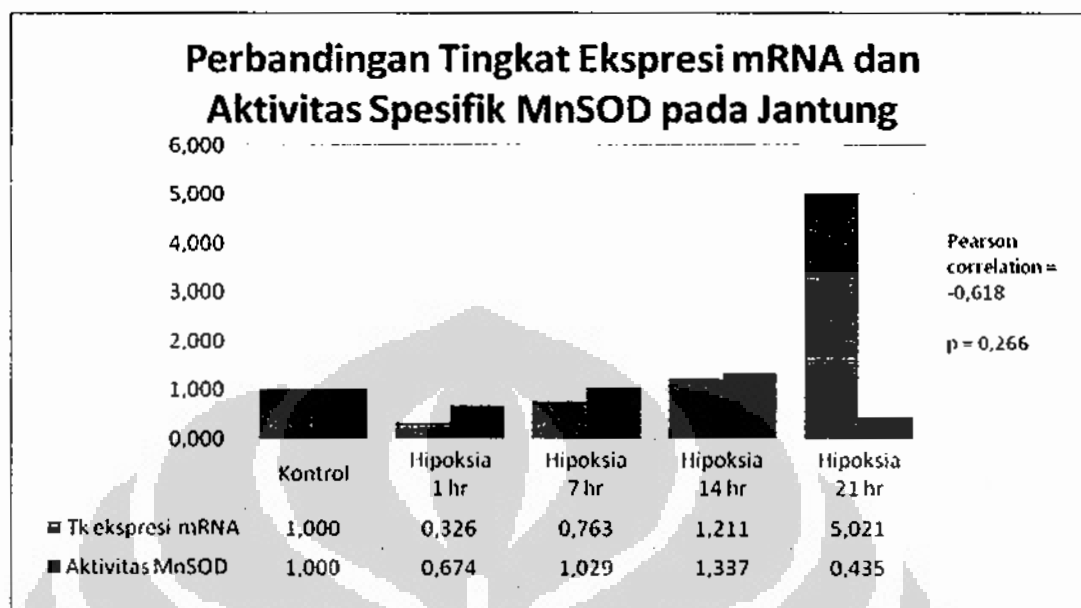
Pola ekspresi relatif mRNA MnSOD pada jantung ini hampir mirip dengan darah. Di awal hipoksia terjadi penurunan ekspresi mRNA MnSOD, karena mungkin jumlah ROS yang dihasilkan pada awal hipoksia masih sedikit sehingga belum dapat menstimulasi peningkatan ekspresi mRNA MnSOD. Setelah itu sejalan dengan lamanya hipoksia ekspresi mRNA MnSOD terjadi peningkatan.



Gambar 4.10. Diagram batang aktivitas spesifik MnSOD (unit/mg protein) pada jantung tikus yang diinduksi hipoksia 0, 1, 7, 14, dan 21 hari. (* = signifikan terhadap kontrol)

Pada jaringan jantung tikus yang mengalami hipoksia awalnya terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD pada jantung tikus yang hipoksia 1 hari secara bermakna dibandingkan dengan kontrol ($p = 0,046$). Kemudian aktivitas MnSOD pada jantung ini mengalami peningkatan sampai hipoksia 14 hari. Kemudian aktivitas MnSOD ini kembali turun pada jantung hipoksia 21 hari secara bermakna, baik dibandingkan dengan jantung tikus hipoksia 14 hari ($p = 0,008$) maupun dengan kontrol ($p = 0,005$), (gambar 4.10).

Aktivitas spesifik MnSOD pada jantung di awal hipoksia terjadi penurunan sesuai dengan ekspresi mRNA-nya yang menurun juga. Pada hipoksia lanjut (21 hari), aktivitas spesifik MnSOD mengalami penurunan, hal ini mungkin disebabkan karena produksi ROS yang berlebihan sehingga enzim mengalami penurunan kemampuan untuk mengolah substratnya (enzim menjadi jenuh).



Gambar 4.11. Diagram batang perbandingan tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas MnSOD pada jantung tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Nilai ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia 1, 7, 14, dan 21 hari dinormalisasi dengan nilai kontrol.

Gambar 4.11. menunjukkan perbandingan antara ekspresi relatif mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada jantung yang diinduksi hipoksia sistemik. Analisis statistik korelasi Pearson pada jantung menghasilkan hubungan negatif sedang antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD ($R = -0,618$). Dari diagram batang dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang mencolok antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD pada tikus hipoksia 21 hari yaitu terjadi peningkatan ekspresi relatif mRNA MnSOD (5 kali dibanding kontrol) namun pada aktivitasnya terjadi penurunan. Namun bila dilakukan analisis statistik sampai perlakuan 14 hari maka dihasilkan hubungan yang positif kuat ($R = 0,943$) antara tingkat ekspresi relatif mRNA dengan aktivitas spesifik MnSOD.

Hal ini menunjukkan bahwa perubahan ekspresi mRNA MnSOD pada jantung sejalan dengan perubahan aktivitas spesifik MnSOD pada induksi hipoksia sistemik awal sampai dengan 14 hari. Perbedaan yang terjadi antara ekspresi mRNA MnSOD dengan aktivitas spesifik MnSOD pada jantung hipoksia lanjut (21 hari) disebabkan

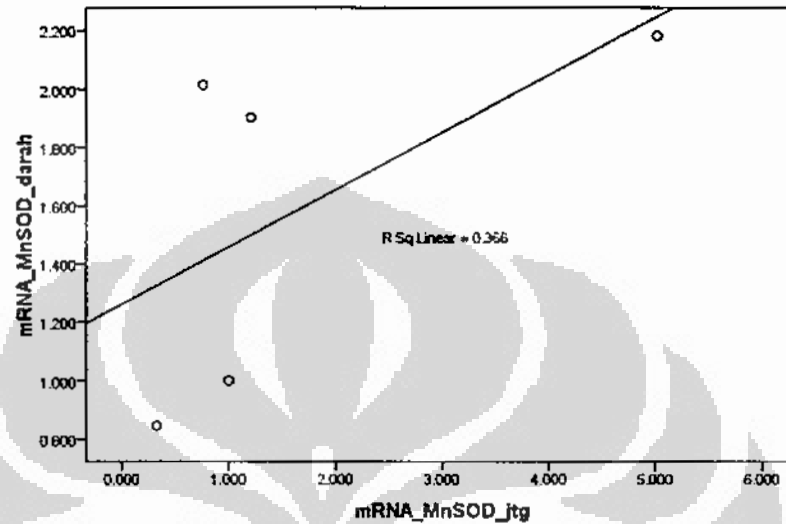
karena ROS yang terbentuk sangat masif, sehingga walaupun ekspresi terus ditingkatkan namun masih belum mencukupi kebutuhan untuk mengatasi stres oksidatif yang terjadi. Selain itu dapat pula disebabkan karena kemampuan MnSOD dalam mengeliminasi ROS yang terakumulasi telah melampaui batasnya, sehingga aktivitas terlihat menurun walaupun ekspresi mRNA terus ditingkatkan. Alasan lain mungkin karena terjadi hambatan translasi protein pada kondisi hipoksia yang lanjut. Karena pada kondisi hipoksia produksi ATP menurun, sehingga sel melakukan mekanisme penghambatan translasi protein untuk menghemat penggunaan ATP ini.⁴⁵ Hal inilah yang menyebabkan mengapa ekspresi mRNA MnSOD tinggi namun aktivitas proteinnya rendah.

4.6. Hubungan antara ekspresi MnSOD pada jantung dan otak dibandingkan dengan darah tikus hipoksia sistemik

Untuk memeriksa ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD yang berasal dari jaringan, tentu kita harus mengambil jaringan tersebut. Dalam aplikasi terhadap manusia, sangat tidak mungkin dilakukan pengambilan jaringan jantung dan otak baik dari penderita maupun orang sehat. Oleh karena itu, perbandingan ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada darah dengan jantung dan otak dalam aplikasi tentu sangat bermanfaat. Cukup dengan memeriksa dari darah saja, diharapkan dapat mewakili gambaran ekspresi MnSOD pada jaringan jantung dan otak.

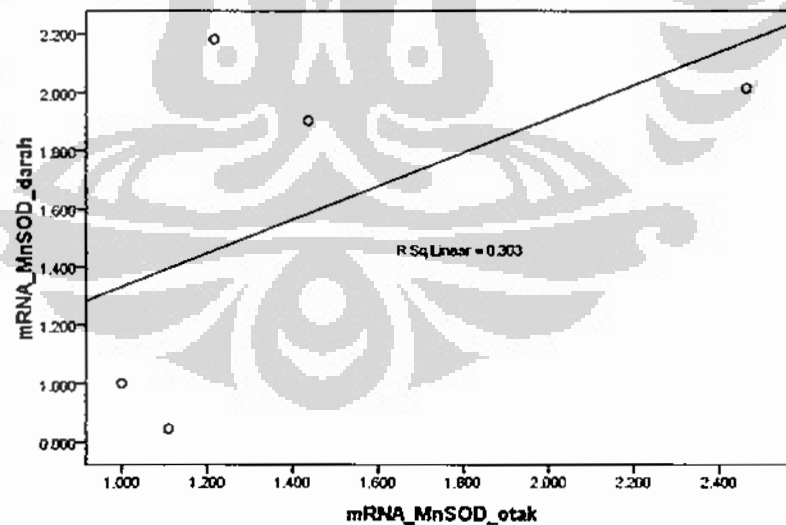
Untuk menganalisis hubungan ekspresi relatif mRNA MnSOD antara jantung, otak dan darah dilakukan analisis statistik (Pearson) dan diperoleh hubungan positif yang berkekuatan sedang antara ekspresi relatif mRNA MnSOD pada darah dan jantung ($R=0,605$) (gambar 4.12), demikian pula pada darah dan otak ($R=0,551$) (gambar 4.13), walaupun secara statistik tidak signifikan ($p>0,05$).

Hubungan antara kadar relatif mRNA MnSOD darah dan jantung



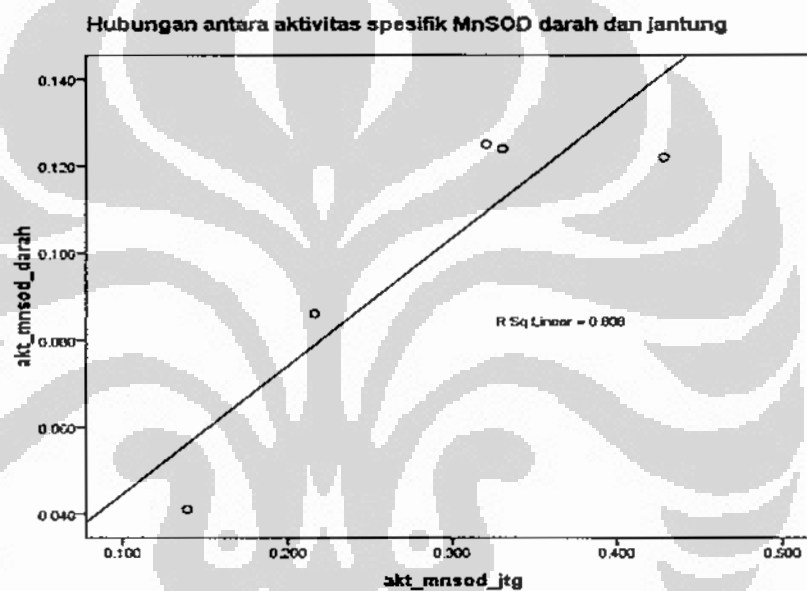
Gambar 4.12. *Scatter plot* hubungan antara tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD jantung dengan darah tikus hipoksia sistemik

Hubungan antara kadar relatif mRNA MnSOD darah dan otak

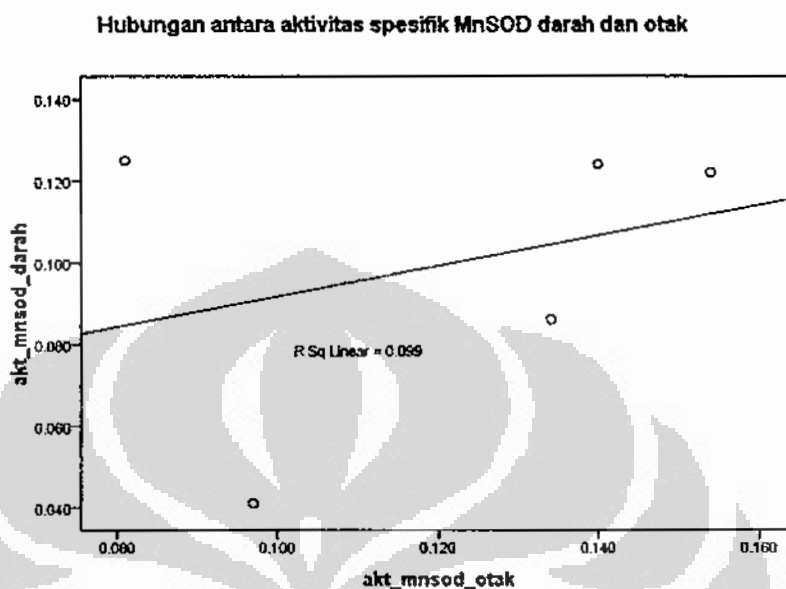


Gambar 4.13. *Scatter plot* hubungan antara tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD otak dengan darah tikus hipoksia sistemik

Analisis Pearson juga dilakukan untuk aktivitas spesifik MnSOD pada ketiga jaringan tersebut. Gambar 4.14 dan 4.15 menunjukkan hasil *scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD darah dengan jantung dan darah dengan otak. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna positif kuat antara darah dan jantung ($R=0,896$, $p<0,05$), sedangkan antara darah dengan otak terdapat hubungan positif lemah ($R=0,317$, $p>0,05$).



Gambar 4.14. *Scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD jantung dengan darah tikus hipoksia sistemik.



Gambar 4.15. *Scatter plot* hubungan antara aktivitas spesifik MnSOD otak dengan darah tikus hipoksia sistemik.

Dari hasil analisis di atas membuktikan bahwa perubahan ekspresi relatif mRNA pada induksi hipoksia sistemik pada darah sejalan dengan perubahannya pada jantung dan otak, walaupun kedua hubungan tersebut berkekuatan sedang. Begitu pula perubahan aktivitas spesifik MnSOD pada darah sejalan dengan jantung (hubungan kuat) dan otak (hubungan lemah). Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa pengukuran ekspresi MnSOD (mRNA dan aktivitas spesifik) pada darah dapat sekaligus menggambarkan ekspresi tersebut pada jantung dan otak.

4.7. Ekspresi gen MnSOD otak dibandingkan dengan jantung dan darah sebagai respons terhadap hipoksia sistemik

Berdasarkan hasil analisis ekspresi gen MnSOD pada darah, otak dan jantung (subbab 4.3, 4.4 dan 4.5) tampak bahwa pola aktivitas spesifik MnSOD pada otak berbeda dengan pola aktivitas spesifik MnSOD pada jantung dan darah. Pada hipoksia awal (1 hari) di otak terjadi peningkatan aktivitas spesifik MnSOD yang

bermakna, namun sebaliknya pada hipoksia awal (1 hari) di jantung dan darah terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD yang bermakna. Pola perubahan aktivitas spesifik MnSOD pada hipoksia awal ini didukung oleh pola perubahan ekspresi mRNA MnSOD yang sesuai, yaitu pada hipoksia awal di otak terjadi peningkatan ekspresi mRNA MnSOD, sebaliknya di jantung dan darah terjadi penurunan ekspresi mRNA MnSOD.

Hal ini menunjukkan bahwa dalam keadaan hipoksia sistemik perlindungan antioksidan pada otak terjadi lebih awal dibandingkan jantung dan darah. Hal ini mungkin disebabkan karena otak lebih sensitif terhadap kondisi rendah oksigen, sehingga otak mempunyai mekanisme autoregulasi untuk menyelamatkan jaringan otak dari kerusakan akibat hipoksia.⁴⁶ Mekanisme ini akan mendahulukan suplai darah ke otak dibandingkan jaringan lain, oleh karena itu otak cenderung kurang hipoksia dibandingkan jaringan lain. Hal ini mungkin juga menyebabkan kadar ROS yang terbentuk pada hipoksia awal di otak tidak terlalu tinggi dibandingkan jaringan jantung dan darah. Sementara itu di jantung dan darah peningkatan produksi ROS sudah terjadi pada hipoksia awal (1 hari), sehingga aktivitas spesifik MnSOD pada kedua jaringan tersebut menurun pada awal hipoksia karena dipakai untuk menangkal ROS yang terbentuk, namun belum cukup waktu untuk menginduksi ekspresi mRNA MnSOD.

Selanjutnya seiring dengan lamanya paparan hipoksia, aktivitas spesifik MnSOD terus ditingkatkan pada ketiga jaringan tersebut sampai hipoksia 14 hari. Hal ini terjadi karena produksi ROS yang terus bertambah seiring dengan lamanya hipoksia, sehingga aktivitas spesifik MnSOD ditingkatkan untuk menangkal ROS ini. Begitu pula ekspresi mRNA MnSOD pada ketiga jaringan tersebut mempunyai korelasi positif berkekuatan sedang-kuat (uji korelasi Pearson) terhadap aktivitas spesifik MnSOD-nya sampai hipoksia 14 hari. Namun pada hipoksia 21 hari di jantung dan darah terdapat korelasi negatif antara aktivitas spesifik MnSOD dengan ekspresi mRNA-nya, yaitu terjadi penurunan aktivitas spesifik MnSOD sebaliknya ekspresi mRNA-nya masih terus meningkat. Hal ini mungkin disebabkan karena produksi ROS yang meningkat secara masif pada hipoksia lanjut sehingga induksi

mRNA masih terus ditingkatkan tetapi masih belum bisa diatasi oleh aktivitas enzim MnSOD yang tersedia. Fenomena tersebut tidak dijumpai pada otak, yang menunjukkan korelasi positif antara aktivitas spesifik MnSOD dengan ekspresi mRNA-nya sampai hipoksia 21 hari. Hal ini disebabkan karena peningkatan produksi ROS yang terjadi pada hipoksia lanjut masih bisa diatasi dengan aktivitas enzim MnSOD yang tersedia tanpa harus meningkatkan ekspresi mRNA-nya. Hal ini mendukung bahwa pada otak cenderung kurang hipoksia dibandingkan jaringan lain.

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa setiap spesies mempunyai pola regulasi MnSOD sendiri. Misalnya pada sel paru-paru kelinci terjadi penurunan baik ekspresi protein MnSOD maupun aktivitasnya pada kondisi hipoksia.⁴⁷ Studi lain melaporkan bahwa pada sel paru-paru tikus terjadi peningkatan aktivitas MnSOD dan toleransi oksigen setelah pemaparan hipoksia.⁴⁸ Sebaliknya terjadi penurunan aktivitas MnSOD serta peningkatan waktu paruh mRNA MnSOD pada sel paru-paru tikus dengan pemaparan oksigen yang tinggi (95%).⁴⁹

Ekspresi gen MnSOD pada keadaan hipoksia mungkin diregulasi oleh faktor transkripsi yang sensitif redoks, yaitu SP-1, AP-1 dan NF- κ B. Faktor transkripsi ini diregulasi oleh status redoks sel.² Bila terjadi peningkatan radikal bebas maka faktor transkripsi ini menjadi aktif. Beberapa penelitian melaporkan, bila terjadi peningkatan ROS, NF- κ B menjadi aktif dan menginduksi gen-gen yang diregulasinya. Oksidasi pada kultur sel mengaktifkan NF- κ B dan terjadi pula induksi MnSOD.⁵⁰ Jadi ekspresi gen MnSOD dalam keadaan hipoksia kemungkinan diregulasi melalui ROS.

Suatu penelitian melaporkan bahwa $O_2^{\cdot -}$ dan H_2O_2 mempunyai peran penghubung antara MnSOD dengan HIF-1 α .^{12,51} Baik $O_2^{\cdot -}$ dan H_2O_2 dapat bereaksi dengan ion besi, yang merupakan kofaktor enzim prolil hidroksilase (enzim yang menghidroksilasi residu prolin pada HIF-1 α sebagai sinyal untuk segera didegradasi). Hal ini didukung oleh penelitian lain yang melaporkan bahwa ekspresi katalase atau glutation peroksidase yang berlebihan akan menurunkan stabilisasi protein HIF-1 α dalam keadaan hipoksia.⁵²

Penelitian Chandel (1998) melaporkan bahwa dalam keadaan hipoksia terjadi peningkatan produksi ROS oleh mitokondria yang akan memberi sinyal pada

stabilisasi HIF-1 α .²⁷ Schumacker (2003) melaporkan bahwa hipoksia menstimulasi pelepasan ROS dari mitokondria yang kemudian dapat meregulasi respons transkripsi dan post transkripsi terhadap kondisi oksigen yang rendah. Penghambatan ROS pada hipoksia, menghambat respons transkripsi terhadap hipoksia.²⁵

Penelitian lain yang memeriksa ekspresi mRNA HIF-1 α pada proyek penelitian yang sama di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, melaporkan bahwa ekspresi mRNA HIF-1 α pada otak tikus yang diinduksi hipoksia sistemik tidak meningkat bermakna dibandingkan pada jaringan jantung dan darah.⁵³ Hal ini mendukung hasil ekspresi gen MnSOD pada otak yang menunjukkan peningkatan yang lebih cepat pada hipoksia awal dibandingkan jantung dan darah. Hal ini disebabkan oleh kadar ROS yang tidak terlalu tinggi pada jaringan otak, sehingga ekspresi mRNA HIF-1 α pada otak tidak terlalu ditingkatkan. Dapat diartikan pula bahwa respons adaptasi otak terhadap hipoksia sistemik berbeda dengan jantung dan darah.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan regulasi ekspresi gen MnSOD pada hipoksia awal (1 hari) dan hipoksia lanjut (> 14 hari). Selain itu ekspresi gen MnSOD pada otak berbeda dengan jantung dan darah dalam keadaan hipoksia sistemik. Hal ini mungkin disebabkan karena otak lebih sensitif terhadap kondisi hipoksia sehingga dalam kondisi hipoksia otak tampaknya cenderung lebih dilindungi dibandingkan dengan jaringan lain (jantung dan darah).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat diambil diantaranya:

1. Jaringan jantung, otak dan darah mempunyai pola ekspresi gen MnSOD dan aktivitas MnSOD yang berbeda pada kondisi hipoksia sistemik, yang menggambarkan respons jaringan yang berbeda.
2. Terdapat perbedaan regulasi ekspresi gen MnSOD antara hipoksia sistemik awal dan lanjut.
3. Perubahan ekspresi MnSOD (mRNA dan aktivitas spesifik) di dalam darah pada keadaan hipoksia sistemik dapat menggambarkan keadaan hipoksia yang terjadi pada jantung dan otak.

5.2. Saran

1. Dilakukan pemeriksaan kadar antioksidan lain seperti katalase dan glutathion peroksidase, juga produk dari radikal bebas seperti MDA dan dikarbonil, untuk mengetahui lebih jauh lagi status oksidatif pada jaringan tikus yang hipoksia.
2. Dilakukan penelitian dengan metode yang sama pada organ lain, seperti hati dan ginjal.
3. Dilakukan analisis hubungan ekspresi MnSOD dengan apoptosis selama hipoksia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80.
2. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res* 2002;3:1-27.
3. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* 2004;51(3):563-85.
4. Sharp FR, Bernaudin M. HIF-1 and oxygen sensing in the brain. *Neuroscience* 2004;5:437-46.
5. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & Development* 2000;14:1983-91.
6. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Gene & Development* 2004;18:2183-94.
7. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 2004;19:176-82.
8. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine* 2004;36(1):1-12.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London: Oxford University Press, 2007:79-95.
10. Hassan HM, Fridovich I. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1978;253:8143-8.
11. Russel WJ, Ho YS, Jackson RM. Effects of hypoxia on MnSOD expression in mouse lung. *Am J Physiol* 1995;2(1):221-6.
12. Wang M, et al. Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 2005;24:8154-66.



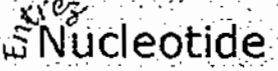
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London: Oxford University Press. 2007:21-2.
14. Superoxide dismutase. Wikipedia Foundaion Inc, US. http://en.wikipedia.org/wiki/superoxide_dismutase. 2008.
15. Simon HU, Yehia AH, Schaffer FL. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5:415-8.
16. Reactive oxygen species. Wikipedia Foundation Inc, US. http://en.wikipwdia.org/wiki/reactive_oxygen_species. 2008.
17. Muller F. The Nature and Mechanism of Superoxide production by the Electron Transport Chain: Its relevance to aging. *J. Amer. Aging Assoc* 2000;23:227-53.
18. Han D, Williams E and Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J* 2001;353:411-416.
19. Suzuki YJ, Forman HJ and Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biol Med* 1997;22:269-85.
20. Fandrey J, Frede S and Jelkmann W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J* 1994;303:507-10.
21. Muller F L, Lustgarten M S, Jang Y, Richardson A and Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43:477-503.
22. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 2004;164:1875-82.
23. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definition and current clinical, biological, and molecular aspect. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-76.
24. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic condition. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997;272:22642-7.
25. Schumacker PT. Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol* 2003;543:57-71.

26. Waypa GB, Schumacker PT. O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: The mitochondrial door re-opens. *Respir Physiol Neurobiol* 2002;132:81-91.
27. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95: 11715-20.
28. Chandel NS, Schumacker PT. Cells depleted of mitochondrial DNA (ρ^0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett* 1999;454:173-6.
29. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: Old question, new insight. *J Appl Physiol* 2000;88:1880-9.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. Reactive species and diseases: fact, fiction or filibuster?. In *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London. Oxford University Press, 2007:514-6.
31. Ho YS, AHoward and J Crapo. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:278-86.
32. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003;13:145-57.
33. Cai Q, Shu X-Q, Wen W, Cheng J-R, Dai Q, Gao Y-T, et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res* 2004;6:647-55.
34. Jefferson J, Perry P, Fan L, Tainer JA. Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and DNA repair. *Neuroscience* 2007; 145(4): 1280-99.
35. Leveque VJ, et al. Multiple replacements of glutamine 143 in human manganese superoxide dismutase: effects on structure, stability, and catalysis. *Biochemistry* 2000;39:7131-7.
36. Guan Y, et al. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochem J* 1998;37:4722-30.

37. Ayala I, et al. Hydrogen bonding in human manganese superoxide dismutase containing 3-fluorotyrosine. *Biophys J* 2005;89:4171-9.
38. Lebovitz, RM et al. Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial SOD-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9782.
39. Kokoszka JE, et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod 2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2278.
40. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 2001;104:979-81.
41. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1992;263:H1356-62.
42. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. p.2-44.
43. Corno AF, Milano G, Samaja M, Tozzi P, von Segesser LK. Chronic hypoxia: a model for cyanotic congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:105-12.
44. Ferdinal F. Mekanisme molekuler gagal jantung yang diinduksi hipoksia: peran HIF-1 α dalam regulasi gen BNP. Disertasi Doktor. Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Indonesia, 2008.
45. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Mol Cell Biol* 2002;22:7405-16.
46. Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of Anatomy and Physiology. 7th ed. New York: Harper Collins College Publishers, 1993:640-4.
47. Russell W J, and R M Jackson. MnSOD protein content changes in hypoxic/hypoperfused lung tissue. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol* 1993;9: 610-6.

48. Sjöstrom K, and J Crapo. Structural and biochemical adaptive changes in rat lungs after exposure to hypoxia. *Lab Invest* 1983;48:68-79.
49. Clerch L B, and D. Massaro. Tolerance of rats to hyperoxia lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 1993;91: 499-508.
50. Ohman T, Parish G, Jackson RM. Hypoxic modulation of manganese superoxide dismutase promoter activity and gene expression in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:119-27.
51. Kaewpila S, Venkataraman S, Buettner GR and Oberley LW. Manganese Superoxide Dismutase Modulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Induction via Superoxide. *Cancer Res* 2008;68(8):2781-8.
52. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism* 2005;1:409-14.
53. Wanandi SI, Dewi S. Peran protein HIF-1 α terhadap regulasi gen MnSOD pada hipoksia sistemik. 2008 (belum dipublikasi).

LAMPIRAN 1. DATA GENE BANK

[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PMC](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)
[Books](#)

Search Nucleotide for

You need JavaScript to work with this page.

Display [GenBank](#) Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: STS

1: [NM_017051](#). Reports *Rattus norvegicus*...[gi:47575854]

Order cDNA clone,
Links

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NM_017051 2090 bp mRNA linear ROD 11-FEB-2008
DEFINITION *Rattus norvegicus* superoxide dismutase 2, mitochondrial (Sod2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
ACCESSION NM_017051
VERSION NM_017051.2 GI:47575854
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 2090)
AUTHORS Sinha, I., Pearce, C.G., Cho, B.S., Hannawa, K.K., Roelofs, K.J., Stanley, J.C., Henke, P.K. and Upchurch, G.R. Jr.
TITLE Differential regulation of the superoxide dismutase family in experimental aortic aneurysms and rat aortic explants
JOURNAL J. Surg. Res. 138 (2), 156-162 (2007)
PUBMED 17196988
REMARK GeneRIF: Experimental abdominal aortic aneurysm formation is associated with early increases in MnSOD expression

REFERENCE 2 (bases 1 to 2090)
AUTHORS Li, Y., Wo, J.M., Su, R.R., Ray, M.B. and Martin, R.C.
TITLE Loss of manganese superoxide dismutase expression and activity in rat esophagus with external esophageal perfusion
JOURNAL Surgery 141 (3), 359-367 (2007)
PUBMED 17349848
REMARK GeneRIF: loss of MnSOD protein contributes to the reduced level of its enzymatic activity and plays a key role in the induction of esophagitis

REFERENCE 3 (bases 1 to 2090)
AUTHORS Danielisova, V., Gottlieb, M., Nemethova, M. and Burda, J.
TITLE Activities of endogenous antioxidant enzymes in the cerebrospinal fluid and the hippocampus after transient forebrain ischemia in rat
JOURNAL J. Neurol. Sci. 253 (1-2), 61-65 (2007)
PUBMED 17215005
REMARK GeneRIF: Ischemic attack causes a rapid response in hippocampal tissue as well as in the cerebrospinal fluid, represented by an increase in the activity of endogenous antioxidant enzymes SOD and CAT

REFERENCE 4 (bases 1 to 2090)
AUTHORS Mao, X., Moerman-Herzog, A.M., Wang, W. and Barger, S.W.
TITLE Differential transcriptional control of the superoxide dismutase-2 kappaB element in neurons and astrocytes
JOURNAL J. Biol. Chem. 281 (47), 35863-35872 (2006)
PUBMED 17023425
REMARK GeneRIF: analysis of transcriptional regulation of the superoxide dismutase-2 kappaB element in rat embryonic neurons and astrocytes

REFERENCE 5 (bases 1 to 2090)
AUTHORS Chen, W., Qiu, J.F., Zhang, Z.Q., Luo, H.F., Rosello-Catafau, J. and Wu, Z.Y.
TITLE Gene expression changes after hypoxic preconditioning in rat hepatocytes
JOURNAL HBPD INT 5 (3), 416-421 (2006)
PUBMED 16911942

REFERENCE 6 (bases 1 to 2090)
AUTHORS Stoehlmacher, J., Ingles, S.A., Park, D.J., Zhang, W. and Lenz, H.J.
TITLE The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma

JOURNAL Oncol. Rep. 9 (2), 235-238 (2002)
 PUBMED [11836586](#)
 REFERENCE 7 (bases 1 to 2090)
 AUTHORS Huang,T.T., Carlson,E.J., Kozy,H.M., Mantha,S., Goodman,S.I.,
 Orsell,P.C. and Epstein,C.J.
 TITLE Genetic modification of prenatal lethality and dilated
 cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice
 JOURNAL Free Radic. Biol. Med. 31 (9), 1101-1110 (2001)
 PUBMED [11677043](#)
 REFERENCE 8 (bases 1 to 2090)
 AUTHORS Lebovitz,R.M., Zhang,H., Vogel,H., Cartwright,J. Jr., Dionne,L.,
 Lu,N., Huang,S. and Matzuk,M.M.
 TITLE Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in
 mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (18), 9782-9787 (1996)
 PUBMED [8790408](#)
 REFERENCE 9 (bases 1 to 2090)
 AUTHORS Ho,Y.S., Howard,A.J. and Crapo,J.D.
 TITLE Molecular structure of a functional rat gene for
 manganese-containing superoxide dismutase
 JOURNAL Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 4 (3), 278-286 (1991)
 PUBMED [2001291](#)
 REFERENCE 10 (bases 1 to 2090)
 AUTHORS Ho,Y.S. and Crapo,J.D.
 TITLE Nucleotide sequences of cDNAs coding for rat manganese-containing
 superoxide dismutase
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 15 (23), 10070 (1987)
 PUBMED [3697077](#)
 COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final
 NCBI review. The reference sequence was derived from [BC070913.1](#).
 On May 24, 2004 this sequence version replaced [gi:8394330](#).

Summary: manganese superoxide dismutase; intramitochondrial free
 radical scavenging enzyme [RGD].

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the
 publications that are available for this gene. Please see the
 Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES

source Location/Qualifiers
 1..2090
 /organism="Rattus norvegicus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:10116"
 /chromosome="1"
 /map="1q21"

gene 1..2090
 /gene="Sod2"
 /note="superoxide dismutase 2, mitochondrial"
 /db_xref="GeneID:24787"
 /db_xref="RATMAP:34443"
 /db_xref="RGD:3732"

CDS 84..752
 /gene="Sod2"
 /note="Superoxide dismutase 2, mitochondrial"
 /codon_start=1
 /product="superoxide dismutase 2"
 /protein_id="NP_058747.1"
 /db_xref="GI:8394331"
 /db_xref="GeneID:24787"
 /db_xref="RATMAP:34443"
 /db_xref="RGD:3732"
 /translation="MLCRAACSAGRRLGPAASTAGSRHKHSLPDLFYDGALEPRINA
 QIMQLHSHKHHRTYVNNLNVTEEKYHEALAKGDVTTQVALQPALKFNGGGHINHSIFW
 TNLSPKGGGEPKGELEAIKRDVFGSFEKPKLTAVSQVGGSGWGLGFNKEQGRLO
 IAACSNQDPLQGTGLIPLLGLDIVERAYYLQYKNVRPDLKAIWNVINWENVSQRYI
 VCKK"

STS 203..443
 /gene="Sod2"
 /standard_name="Sod2"
 /db_xref="UniSTS:144478"

STS 632..825
 /gene="Sod2"
 /standard_name="RH130474"
 /db_xref="UniSTS:213756"

STS 1220..1418
 /gene="Sod2"

/standard_name="RR140197"
/db_xref="UniSTS:222276"

ORIGIN

```

1  cggcgccgacg ccgcagagca gacgcgcggc tgctagcgaa cggccctggt ctgaggagag
61  cagcggtcgt gggcgccctca gcaatggtgt gtcgggcggc gtgcagcgcg ggcagaagac
121 tgggccccgc gggcagtacc gggggctccc ggcacaagca cagcctccct gacctgcctt
181 acgactatgg cgcgctggag ccgcacatta acgcgagat catgcagcty caccacagca
241 agcaccacgc gacctacgtg aacaatctga acgtcaccga ggagaagtac cacgaggcgc
301 tggccaaggg agatgttaca actcaggttg ctcttcagcc tgcactgaag ttcaatggcg
361 ggggccatat caatcacagc atttcttggg caaacctgag ccctaagggg ggtggagaac
421 ccaaaggaga gttgctggag gctatcaagc gtgactttgg gtcttttgag aagtttaagg
481 agaaactgac agctgtgtct gtgggagtc aaggttcagg ctggggctgg cttggcttca
541 ataaggagca aggtcgctta cagattgccg cctgctctaa tcaggacca ctgcaaggaa
601 ccacaggcct tattccactg ctggggattg atgtgtggga gcacgcttac tatcttcagt
661 ataaaaactg cagacctgac tatctgaaag ccattttgaa tgtaatcaac tgggagaatg
721 ttagccaaag atacatagtt tgcaagaagt gaagcccttc cgccaggctg tgtgtcaggc
781 ccgtggtggg tgttttgtag tagtgragag cattgcagca ctgtggctga gctgtgttaa
841 tcttcattga tgccatcca catatgtgta agcatacagt tatgataatt tcttaattaa
901 atgtattggt aggcaactgt ttgagaacag tacatacttg gtgtgagctg ctcttgattg
961 aacattttca ttagaggett gaattgcttg gacgctgtca ctgtcatcat aaggccatca
1021 aagatattcc atctctgtgt tggggcctgt ggggaggctg taatcctggt ctactgcagt
1081 taggaaaaaa aatgagttac ccccccccc agaattgttg aataataaaa tagagaactg
1141 aatagttctc tttctgtta aaaattgcta ttttccataa gtaatccttt gtttagcggg
1201 tatcacctag tggctttat ttatggccac agtttcatag aaacatcatt tttcacttg
1261 aaacgtgtaa ctaggctaag gatggatgga gtggtagagc ctttgctgt cttatgtgag
1321 gccctgggct ctacctcact actgaacaaa tcaacagacc caagctaggc tctgtactga
1381 caactgttaa ttcggagagg agtgacattg tgccctggg ttttttata ggtgagatg
1441 caaaaactgt taccttgtct attaaaaacc actgtgtatt gtatgaaagt gctcaagatg
1501 gacaaaagtat gcaggcctg tcccatgatg tcaacatggg gacteggcca caggcattc
1561 agggaagcca ttcagcacca ttaattgtgt atctcaggag aactggacc tgggtgaggt
1621 ggcacctttt tcagtagagg caaacgggtt tctgagtgag gtcagtaggg tgccttgaga
1681 acatcagttt tcagagacat gtattttcat ttttctgca gtcctcaagaa cttatactca
1741 caagagggcc tttgtattgt tatcaatag aaggacacc tttccctgac aaggtacaca
1801 gtgtttctga ttgtattcct gtgcagcatt tgggtgtaga gctgtgcact gttgaaatgc
1861 ctttgtgaat ttgccttttc acatttcgtc tcaccatctt ccttgttttc tttactgact
1921 atgtaatggt ttatcagttg gatattactg aatagtttgt ttgtgtttaa ttgccttta
1981 ttaccaaaaa ggtgtgtgtc agcaacccca ggcattgaca ttacttctta atggagtatt
2041 ttttaagggt ttattttaat ttttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Last update: Thu, 03 Jul 2008 Rev. 132917



My NCBI

[\[Sign In\]](#) [\[Register\]](#)[PubMed](#)[Nucleotide](#)[Protein](#)[Genome](#)[Structure](#)[PMC](#)[Taxonomy](#)[OMIM](#)[Books](#)

Search Nucleotide

for

You need JavaScript to work with this page.

Display [GenBank](#) Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin

to end

 Reverse complemented strandFeatures: STS 1: [NM_031144](#). Reports *Rattus norvegicus*...[gi:42475962][Order cDNA clone,](#)[Links](#)[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NM_031144 1296 bp mRNA linear ROD 22-JUN-2008
 DEFINITION *Rattus norvegicus* actin, beta (Actb), mRNA.
 ACCESSION NM_031144
 VERSION NM_031144.2 GI:42475962
 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 1296)
 AUTHORS Noda,Y., Horikawa,S., Katayama,Y. and Sasaki,S.
 TITLE Identification of a multiprotein 'motor' complex binding to water channel aquaporin-2
 JOURNAL *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (4), 1041-1047 (2005)
 PUBMED [15823548](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Noda,Y., Horikawa,S., Katayama,Y. and Sasaki,S.
 TITLE Water channel aquaporin-2 directly binds to actin
 JOURNAL *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (3), 740-745 (2004)
 PUBMED [15336526](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Navarro-Lerida,I., Martinez Moreno,M., Roncal,F., Gavilanes,F., Albar,J.P. and Rodriguez-Crespo,I.
 TITLE Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8
 JOURNAL *Proteomics* 4 (2), 339-346 (2004)
 PUBMED [14760703](#)

REFERENCE 4 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Eom,T., Antar,L.N., Singer,R.E. and Bassell,G.J.
 TITLE Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses
 JOURNAL *J. Neurosci.* 23 (32), 10433-10444 (2003)
 PUBMED [14614102](#)

REMARK GeneRIF: The molecular mechanism and function of beta-actin mRNA localization in dendrites of cultured hippocampal neurons was studied; ZBP1 is required for the localization of beta-actin mRNA to dendrites

REFERENCE 5 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Kukita,T., Kukita,A., Xu,L., Toh,K., Tang,Q., Nomiya,H. and Iijima,T.
 TITLE Extremely high expression of beta-actin mRNA in osteoclasts resorbing alveolar bone located at the distal area of the developing molar tooth germ in newborn rats
 JOURNAL *J Electron Microscop (Tokyo)* 52 (6), 545-550 (2003)
 PUBMED [14756242](#)

REMARK GeneRIF: extremely high levels of beta-actin mRNA in osteoclasts observed in developing molar tooth germ in the mandibular bone surface

REFERENCE 6 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Suginta,W., Karoulias,N., Aitken,A. and Ashley,R.H.
 TITLE Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms
 JOURNAL *Biochem. J.* 359 (PT 1), 55-64 (2001)
 PUBMED [11563969](#)

REFERENCE 7 (bases 1 to 1296)
 AUTHORS Lee,S., Park,J.B., Kim,J.R., Kim,Y., Kim,J.E., Shin,K.J., Lee,J.S.,

Ha, S.H., Suh, P.G. and Ryu, S.H.
TITLE Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity
JOURNAL J. Biol. Chem. 276 (30), 28252-28260 (2001)
PUBMED [11373276](#)
REFERENCE 8 (bases 1 to 1296)
AUTHORS Park, F., Mattson, D.L., Roberts, L.A. and Cowley, A.W. Jr.
TITLE Evidence for the presence of smooth muscle alpha-actin within pericytes of the renal medulla
JOURNAL Am. J. Physiol. 273 (5 PT 2), R1742-R1748 (1997)
PUBMED [9374818](#)
REFERENCE 9 (bases 1 to 1296)
AUTHORS Shartava, A., Korn, W., Shah, A.K. and Goodman, S.R.
TITLE Irreversibly sickled cell beta-actin: defective filament formation
JOURNAL Am. J. Hematol. 55 (2), 97-103 (1997)
PUBMED [9209005](#)
REFERENCE 10 (bases 1 to 1296)
AUTHORS Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D.
TITLE The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene
JOURNAL Nucleic Acids Res. 11 (6), 1759-1771 (1983)
PUBMED [6300777](#)
COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from [BC063166.1](#). On Feb 9, 2004 this sequence version replaced [gi:13592132](#).

Summary: mRNA expression increases following axon injury; may play a role in acceleration of axonal outgrowth [RGD].

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Entrez Gene record to access additional publications.

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..1296 /organism="Rattus norvegicus" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon:10116" /chromosome="12" /map="12p11"
gene	1..1296 /gene="Actb" /synonym="Actr" /note="actin, beta" /db_xref="GeneID:81822" /db_xref="RGD:628837"
CDS	82..1209 /gene="Actb" /note="cytoplasmic beta-actin" /codon_start=1 /product="actin, beta" /protein_id="NP_112406.1" /db_xref="GI:13592133" /db_xref="GeneID:81822" /db_xref="RGD:628837" /translation="MDDDIALLVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGV VGMGQKDSYVGDQAQSRGILTLKYPTEIEGIVTNWDDMEKIWHHTFFNELRVAPPEHP VLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVT HTVPIYEGYALPHAILRLDLGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAREIVRDIKEKLCY VALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESC GIEHTFNSIMKCDVDIRKDYANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEITALPSTMKIKI APPERKYSVWIGGSIILASLSTFQMWISKQYDESGPSIVHRRCF"
STS	82..231 /gene="Actb" /standard_name="PMC207566P4" /db_xref="UniSTS:271957"
STS	85..524 /gene="Actb" /standard_name="PMC97445P1" /db_xref="UniSTS:273650"
STS	85..523 /gene="Actb" /standard_name="PMC122924P2" /db_xref="UniSTS:270416"
STS	112..432 /gene="Actb" /standard_name="PMC30411P1" /db_xref="UniSTS:272535"

STS 183..425
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC18465P1"
 /db_xref="UniSTS:271688"
 STS 183..425
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC24644P4"
 /db_xref="UniSTS:272270"
 STS 199..273
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC24942P1"
 /db_xref="UniSTS:272277"
 STS 202..361
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC117352P1"
 /db_xref="UniSTS:270329"
 STS 207..720
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC107891P1"
 /db_xref="UniSTS:270127"
 STS 225..724
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC209527P1"
 /db_xref="UniSTS:271999"
 STS 247..482
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC137792P1"
 /db_xref="UniSTS:270855"
 STS 252..711
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC33279P1"
 /db_xref="UniSTS:273159"
 STS 269..805
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC133998P8"
 /db_xref="UniSTS:270713"
 STS 280..723
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC86032P2"
 /db_xref="UniSTS:273511"
 STS 288..522
 /gene="Actb"
 /standard_name="Actb"
 /db_xref="UniSTS:496720"
 STS 336..465
 /gene="Actb"
 /standard_name="LOC345651"
 /db_xref="UniSTS:265879"
 STS 337..666
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC356969P12"
 /db_xref="UniSTS:273274"
 STS 338..491
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC350549P3"
 /db_xref="UniSTS:273239"
 STS 410..805
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC149351P1"
 /db_xref="UniSTS:271029"
 STS 414..846
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC137548P2"
 /db_xref="UniSTS:270841"
 STS 414..496
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC125678P1"
 /db_xref="UniSTS:270504"
 STS 437..622
 /gene="Actb"
 /standard_name="RI01350"
 /db_xref="UniSTS:463064"
 STS 447..764
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC115141P1"
 /db_xref="UniSTS:270285"

STS 448..942
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC224995P1"
 /db_xref="UniSTS:272113"
 STS 450..767
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC99880P2"
 /db_xref="UniSTS:273691"
 STS 452..808
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC85361P1"
 /db_xref="UniSTS:273471"
 STS 454..815
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC180915P1"
 /db_xref="UniSTS:271667"
 STS 471..720
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC37512P3"
 /db_xref="UniSTS:273307"
 STS 471..690
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC102156P1"
 /db_xref="UniSTS:270076"
 STS 481..584
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC151804P4"
 /db_xref="UniSTS:271178"
 STS 487..1047
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC96811P1"
 /db_xref="UniSTS:273633"
 STS 500..974
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC23951P1"
 /db_xref="UniSTS:272215"
 STS 506..943
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC154439P1"
 /db_xref="UniSTS:271310"
 STS 521..740
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC187403P1"
 /db_xref="UniSTS:271725"
 STS 525..951
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC110672P1"
 /db_xref="UniSTS:270192"
 STS 563..1027
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC117780P1"
 /db_xref="UniSTS:270340"
 STS 597..1177
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC98352P1"
 /db_xref="UniSTS:273669"
 STS 599..1204
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC109669P1"
 /db_xref="UniSTS:270176"
 STS 602..1221
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC150974P1"
 /db_xref="UniSTS:271127"
 STS 605..763
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC133768P1"
 /db_xref="UniSTS:270660"
 STS 649..1091
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC26753P1"
 /db_xref="UniSTS:272350"
 STS 693..1145
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC114236P1"
 /db_xref="UniSTS:270264"

STS 760..1191
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC138011P1"
 /db_xref="UniSTS:270859"
 STS 779..1211
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC87052P1"
 /db_xref="UniSTS:273574"
 STS 793..951
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC340938P1"
 /db_xref="UniSTS:273170"
 STS 842..1201
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC102052P1"
 /db_xref="UniSTS:270068"
 STS 887..1235
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC108483P1"
 /db_xref="UniSTS:270139"
 STS 887..1235
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC125345P1"
 /db_xref="UniSTS:270489"
 STS 887..1235
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC133829P1"
 /db_xref="UniSTS:270667"
 STS 887..1228
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC117781P1"
 /db_xref="UniSTS:270341"
 STS 887..1061
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC136359P1"
 /db_xref="UniSTS:270796"
 STS 890..1231
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC19354P1"
 /db_xref="UniSTS:271749"
 STS 892..1232
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC145386P1"
 /db_xref="UniSTS:270999"
 STS 892..1206
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC33181P2"
 /db_xref="UniSTS:273155"
 STS 926..1210
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC21071P1"
 /db_xref="UniSTS:272011"
 STS 931..1152
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC20960P1"
 /db_xref="UniSTS:272003"
 STS 939..1235
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC139793P1"
 /db_xref="UniSTS:270897"
 STS 942..1199
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC240671P1"
 /db_xref="UniSTS:272217"
 STS 970..1257
 /gene="Actb"
 /standard_name="Actb-rs1"
 /db_xref="UniSTS:141017"
 STS 1036..1110
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC212730P1"
 /db_xref="UniSTS:272026"
 STS 1073..1194
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC122623P1"
 /db_xref="UniSTS:270405"

STS 1142..1266
 /gene="Actb"
 /standard_name="PMC151001P2"
 /db_xref="UniSTS:271130"

ORIGIN

```

1 ggggtcgagt cgcgctccac cgcgagtac aacctcttg cagctcctcc gtcgcccgtc
61 cacaccgcc accagtctgc catggatgac gatatcgctg cgctcgtcgt cgacaacggc
121 tccggcatgt gcaaggccgg cttcgcgggc gacgatgctc cccgggcccgt cttcccctcc
181 atcgtgggccc gccctaggca ccagggtgtg atgggtgggta tgggtcagaa ggactcctac
241 gtgggcgagc aggccagag caagagaggc atcctgacct tgaagtacct cattgaacac
301 ggcattgtca ccaactggga cgatattggg aagatttggc accacacttt ctacaatgag
361 ctgcgtgtgg cccctgagga gcacctgtg ctgctcaccg aggccctctc gaaccetaag
421 gccaacctgt aaaagatgac ccagatcatg tttgagacct tcaacacccc agccatgtac
481 gtaggcatcc aggtgtgtt gtcctgtat gcctctggtc gtaccactgg cattgtgatg
541 gactccggag acggggctac ccacactgtg cccatctatg agggttacgc gctccctcat
601 gccatcctgc gctcggacct ggctggccgg gacctgacag actacctcat gaagatcctg
661 accgagcgtg gctacagctt caccaccaca gctgagaggg aaatcgtgcg tgacattaaa
721 gagaagctgt gctatgttc cctagacttc gagcaagaga tggccactgc cgcctcctct
781 tctcctctgg agaagagcta tgagctgcct gacggtcagg tcatcactat cggcaatgag
841 cggttccgat gccccgaggc tctctccag ccttctctcc tgggtatgga atcctgtggc
901 atccatgaaa ctacattcaa ttccatcatg aagtgtgacg ttgacatccg taaagacctc
961 tatgccaaca cagtgtctc tgggtgcacc accatgtacc caggcattgc tgacaggatg
1021 cagaaggaga ttactgccct ggctcctagc accatgaaga tcaagatcat tgctcctcct
1081 gagcgcaagt actctgtgtg gattggtggc totatcctgg cctcactgtc caccttccag
1141 cagatgtgga tcagcaagca ggagtacgat ggtccggcc cctccatcgt gcaccgaaa
1201 tgcctctagg cggactgta ctgagctgcy ttttacacc tttctttgac aaaacctaac
1261 ttgcgcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
 NCBI | NLM | NIH

Last update: Thu, 03 Jul 2008 Rev. 132917

LAMPIRAN 3

Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA Darah

Sample	A 260nm	RNA conc.(ng/ul)	Dilution	Vol. Templ.(ul)	7 Sample (ul)	Vol.aqua (ul)	7Sample (ul)	End vol.(ul)	Amount (ng)
C1	0,055	220	4,643	1,4	9,8	5,1	35,7	6,5	308
C2	0,0205	82	1,757	3,7	25,9	2,8	19,6	6,5	303,4
C3	0,024	96	2,031	3,2	22,4	3,3	23,1	6,5	307,2
C4	0,0635	254	5,417	1,2	8,4	5,3	37,1	6,5	304,8
C5	0,022	88	1,857	3,5	24,5	3	21	6,5	308
A1	0,0245	98	2,097	3,1	21,7	3,4	23,8	6,5	303,8
A2	0,033	132	2,826	2,3	16,1	4,2	29,4	6,5	303,6
A3	0,0405	162	3,421	1,9	13,3	4,6	32,2	6,5	307,8
A4	0,0375	150	3,250	2	14	4,5	31,5	6,5	300
A5	0,073	292	6,190	1,05	7,35	5,45	38,15	6,5	306,6
B1	0,0115	46	1,000	6,5		0		6,5	299
B2	0,0915	366	8,125	0,8	5,6	5,7	39,9	6,5	292,8
B3	0,017	68	1,512	4,3	30,1	2,2	15,4	6,5	292,4
B4	0,039	156	3,421	1,9	13,3	4,6	32,2	6,5	296,4
B5	0,166	664	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	298,8
D1	0,0135	54	1,161	5,6	39,2	0,9	6,3	6,5	302,4
D2	0,0685	274	5,909	1,1	7,7	5,4	37,8	6,5	301,4
D3	0,0145	58	1,250	5,2	36,4	1,3	9,1	6,5	301,6
D4	0,1015	406	8,667	0,75	5,25	5,75	40,25	6,5	304,5
D5	0,027	108	2,321	2,8	19,6	3,7	25,9	6,5	302,4
E1	0,129	516	10,833	0,6	4,2	5,9	41,3	6,5	309,6
E2	0,076	304	6,500	1	7	5,5	38,5	6,5	304
E3	0,065	260	5,417	1,2	8,4	5,3	37,1	6,5	312
E4	0,043	172	3,611	1,8	12,6	4,7	32,9	6,5	309,6

Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA Otak

Sample	A 260nm	RNA conc.(ng/ul)	Dilution	Vol. Templ.(ul)	7Sample (ul)	Vol.aqua (ul)	7Sample (ul)	End vol.(ul)	Amount (ng)
C1	0,049	196	2,500	2,6	18,2	3,9	27,3	6,5	509,6
C2	0,022	88	1,140	5,7	39,9	0,8	5,6	6,5	501,6
C3	0,067	268	3,421	1,9	13,3	4,6	32,2	6,5	509,2
C4	0,049	196	2,500	2,6	18,2	3,9	27,3	6,5	509,6
C5	0,035	140	1,806	3,6	25,2	2,9	20,3	6,5	504
A1	0,011	44	1,000	6,5		0		6,5	286
A2	0,032	128	1,667	3,9	27,3	2,6	18,2	6,5	499,2
A3	0,021	84	1,083	6	42	0,5	3,5	6,5	504
A4	0,052	208	2,708	2,4	16,8	4,1	28,7	6,5	499,2
A5	0,258	1032	13,000	0,5	3,5	6	42	6,5	516
B1	0,017	68	1,000	6,5		0		6,5	442
B2	0,035	140	1,806	3,6	25,2	2,9	20,3	6,5	504
B3	0,058	232	2,955	2,2	15,4	4,3	30,1	6,5	510,4
B4	0,052	208	2,708	2,4	16,8	4,1	28,7	6,5	499,2
B5	0,315	1260	16,250	0,4	2,8	6,1	42,7	6,5	504
D1	0,041	164	2,097	3,1	21,7	3,4	23,8	6,5	508,4
D2	0,032	128	1,667	3,9	27,3	2,6	18,2	6,5	499,2
D3	0,094	376	4,815	1,35	9,45	5,15	36,05	6,5	507,6
D4	0,051	204	2,600	2,5	17,5	4	28	6,5	510
D5	0,055	220	2,826	2,3	16,1	4,2	29,4	6,5	506
E1	0,146	584	7,386	0,88	6,16	5,62	39,34	6,5	513,92
E2	0,214	856	10,833	0,6	4,2	5,9	41,3	6,5	513,6
E3	0,277	1108	14,130	0,46	3,22	6,04	42,28	6,5	509,68
E4	0,18	720	9,286	0,7	4,9	5,8	40,6	6,5	504

Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA Jantung

Sample	A 260nm	RNA conc.(ng/ul)	Dilution	Vol. Templ.(ul)	7Sample (ul)	Vol. aqua (ul)	7Sample (ul)	End vol.(ul)	Amount (ng)
C1	0,086	344	7,222	0,9	6,3	5,6	39,2	6,5	309,6
C2	0,178	712	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	320,4
C3	0,268	1072	21,667	0,3	2,1	6,2	43,4	6,5	321,6
C4	0,253	1012	21,667	0,3	2,1	6,2	43,4	6,5	303,6
C5	0,179	716	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	322,2
A1	0,102	408	8,667	0,75	5,25	5,75	40,25	6,5	306
A2	0,171	684	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	307,8
A3	0,203	812	17,105	0,38	2,66	6,12	42,84	6,5	308,56
A4	0,081	324	6,842	0,95	6,65	5,55	38,85	6,5	307,8
A5	0,192	768	16,250	0,4	2,8	6,1	42,7	6,5	307,2
B1	0,146	584	12,037	0,54	3,78	5,96	41,72	6,5	315,36
B2	0,122	488	10,000	0,65	4,55	5,85	40,95	6,5	317,2
B3	0,13	520	10,833	0,6	4,2	5,9	41,3	6,5	312
B4	0,141	564	11,607	0,56	3,92	5,94	41,58	6,5	315,84
B5	0,2	800	16,250	0,4	2,8	6,1	42,7	6,5	320
D1	0,129	516	10,833	0,6	4,2	5,9	41,3	6,5	309,6
D2	0,174	696	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	313,2
D3	0,185	740	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	333
D4	0,176	704	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	316,8
D5	0,255	1020	21,667	0,3	2,1	6,2	43,4	6,5	306
E1	0,217	868	18,056	0,36	2,52	6,14	42,98	6,5	312,48
E2	0,174	696	14,444	0,45	3,15	6,05	42,35	6,5	313,2
E3	0,2	800	16,250	0,4	2,8	6,1	42,7	6,5	320
E4	0,157	628	13,000	0,5	3,5	6	42	6,5	314

LAMPIRAN 4

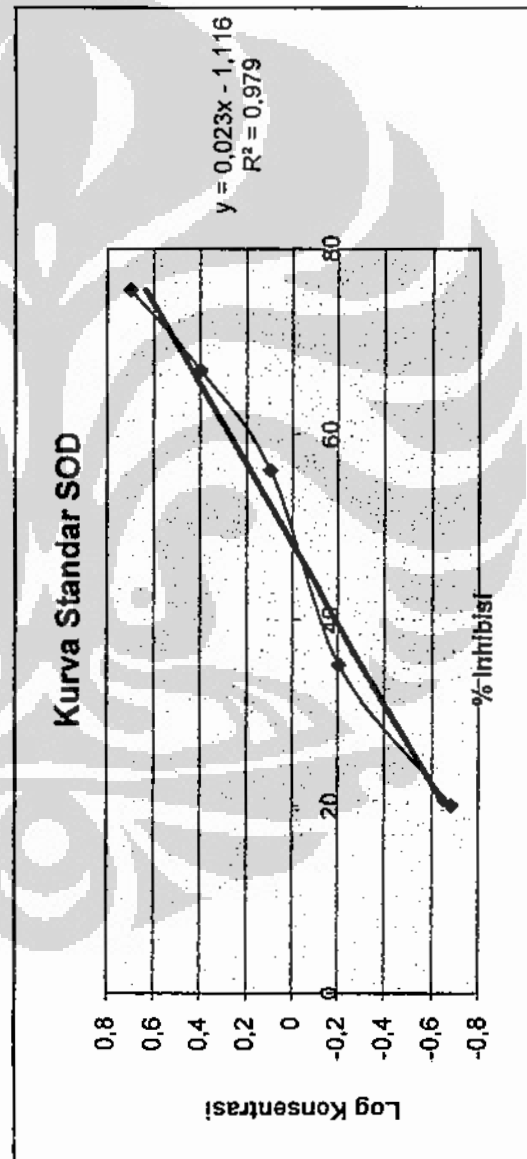
Hasil perhitungan tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD berdasarkan rumus Pfaffli

Sampel	Perlakuan	E (MnSOD)	E (BA)	Ct (MnSOD)	Ct (BA)	ΔCt target	ΔCt ref	E target (Ct)	E ref (Ct)	Tk ekspresi
Darah	Kontrol	1,8925	1,9588	20,6963	17,0400	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Hipoksia 1 hr	1,9013	1,9913	17,0688	13,4113	3,6275	3,6288	10,2852	12,1745	0,8448
	Hipoksia 7 hr	1,7650	1,7183	19,5150	17,0933	1,1813	-0,0533	1,9564	0,9715	2,0137
	Hipoksia 14 hr	1,6600	1,6450	25,9050	23,6350	-5,2088	-6,5950	0,0714	0,0375	1,9016
	Hipoksia 21 hr	1,8938	1,8775	16,8038	14,3325	3,8925	2,7075	12,0082	5,5045	2,1815
Otak	Kontrol	1,8260	1,8620	17,2200	14,3980	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Hipoksia 1 hr	1,6940	1,8300	16,9020	14,2940	0,3180	0,1040	1,1825	1,0649	1,1105
	Hipoksia 7 hr	1,8000	1,7650	24,6200	23,6400	-7,4000	-9,2420	0,0129	0,0052	2,4626
	Hipoksia 14 hr	1,9000	1,4900	17,6700	16,0300	-0,4500	-1,6320	0,7491	0,5216	1,4362
	Hipoksia 21 hr	1,8913	1,8725	15,9988	13,4700	1,2213	0,9280	2,1776	1,7898	1,2167
Jantung	Kontrol	1,9030	1,9480	18,1710	18,0970	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Hipoksia 1 hr	1,8538	1,8175	19,6688	17,7700	-1,4978	0,3270	0,3968	1,2158	0,3263
	Hipoksia 7 hr	1,8500	1,9075	19,3338	18,7863	-1,1628	-0,6892	0,4890	0,6408	0,7632
	Hipoksia 14 hr	1,8563	1,9030	18,9088	19,1040	-0,7377	-1,0070	0,6336	0,5231	1,2112
	Hipoksia 21 hr	1,7625	1,7475	26,8613	29,8113	-8,6903	-11,7143	0,0073	0,0014	5,0213

LAMPIRAN 5

Standar SOD

Standar	A1	A2	ΔA	ΔA/mnt	100,000	% Inhibisi	Kons (U/mL)	Log Kons	% Inhibisi
S1	0,015	0,154	0,139	0,046	100,000	0,000	0,000		
S2	0,078	0,189	0,111	0,037	79,856	20,144	0,208	-0,681	20,144
S3	0,042	0,132	0,090	0,030	64,748	35,252	0,625	-0,204	35,252
S4	0,040	0,101	0,061	0,020	43,885	56,115	1,250	0,097	56,115
S5	0,034	0,080	0,046	0,015	33,094	66,906	2,500	0,398	66,906
S6	0,032	0,066	0,034	0,011	24,460	75,540	5,000	0,699	75,540



LAMPIRAN 5

Aktivitas Spesifik MnSOD Darah

Sampel	A1	A2	ΔA	ΔA/mnt	% Inhibisi	Log Kons	Kons (U/ml)	Protein (mg/ml)	Kons (U/mg prot)	Rata2
Kontrol	C1	0,082	0,171	0,089	0,030	32,601	0,4376	2,2893	0,1399	0,1252
	C2	0,081	0,172	0,091	0,030	33,333	0,4237	2,6918	0,1098	
	C3	0,106	0,186	0,08	0,027	29,304	0,5002	3,6981	0,1243	
	C4	0,096	0,187	0,091	0,030	33,333	0,4237	2,8428	0,1040	
	C5	0,141	0,23	0,089	0,030	76,068	0,4771	3,2201	0,1482	
Hipoksia 1 hr										
	A1	0,078	0,17	0,092	0,031	33,700	0,4167	2,4654	0,1152	0,0862
	A2	0,079	0,175	0,096	0,032	35,165	0,3889	2,8931	0,0836	
	A3	0,109	0,207	0,098	0,033	35,897	0,3749	3,6730	0,0608	
	A4	0,099	0,193	0,094	0,031	34,432	0,4028	3,8742	0,0677	
	A5	0,12	0,205	0,085	0,028	72,650	0,5585	5,3836	0,1037	
Hipoksia 7 hr										
	B1	0,071	0,152	0,081	0,027	29,670	0,4933	2,7170	0,1625	0,1240
	B2	0,087	0,172	0,085	0,028	31,136	0,4654	3,5220	0,1068	
	B3	0,101	0,189	0,088	0,029	32,234	0,4445	2,4906	0,1339	
	B4	0,106	0,192	0,086	0,029	31,502	0,4585	3,6730	0,0984	
	B5	0,161	0,25	0,089	0,030	76,068	0,4771	4,0252	0,1185	
Hipoksia 14 hr										
	D1	0,087	0,173	0,086	0,029	31,502	0,4585	2,9686	0,1217	0,1218
	D2	0,183	0,275	0,092	0,031	33,700	0,4167	2,7421	0,1036	
	D3	0,09	0,178	0,088	0,029	32,234	0,4445	2,7421	0,1216	
	D4	0,112	0,197	0,085	0,028	31,136	0,4654	3,1698	0,1187	
	D5	0,134	0,211	0,077	0,026	65,812	0,4771	5,3333	0,1435	
Hipoksia 21 hari										
	E1	0,124	0,203	0,079	0,026	67,521	0,4771	3,3459	0,2114	0,2194
	E2	0,128	0,208	0,08	0,027	68,376	0,4771	3,1698	0,2145	
	E3	0,135	0,213	0,078	0,026	66,667	0,4771	3,5975	0,2045	
	E4	0,127	0,204	0,077	0,026	65,812	0,4771	3,0943	0,2473	

Aktivitas Spesifik MnSOD Jaringan Otak

Sampel	A1	A2	ΔA	ΔA/mnt	% Inhibisi	Log Kons	Kons (U/ml)	Protein (mg/ml)	Kons (U/mg prot)	Rata2		
Kontrol	C1	0,089	0,166	0,077	0,026	28,205	71,795	0,5353	0,8126	11,2579	0,0722	0,0807
	C2	0,073	0,156	0,083	0,028	30,403	69,597	0,4847	0,6466	8,4277	0,0767	
	C3	0,07	0,151	0,081	0,027	29,670	70,330	0,5016	0,6978	8,8050	0,0792	
	C4	0,066	0,149	0,083	0,028	30,403	69,597	0,4847	0,6466	7,4214	0,0871	
	C5	0,147	0,214	0,067	0,022	57,265	42,735	0,9547	1,1342	12,8302	0,0884	
Hipoksia 1 hr												
	A1	0,087	0,163	0,076	0,025	27,839	72,161	0,5437	0,8442	4,6541	0,1814	0,1337
	A2	0,117	0,204	0,087	0,029	31,868	68,132	0,4510	0,5552	4,3396	0,1279	
	A3	0,077	0,165	0,088	0,029	32,234	67,766	0,4426	0,5344	5,0314	0,1062	
	A4	0,07	0,162	0,092	0,031	33,700	66,300	0,4989	0,4589	4,2767	0,1073	
	A5	0,144	0,205	0,061	0,020	52,137	47,863	0,1573	1,4364	9,8742	0,1455	
Hipoksia 7 hr												
	B1	0,08	0,166	0,086	0,029	31,502	68,498	0,4595	0,5767	4,2138	0,1369	0,1402
	B2	0,072	0,15	0,078	0,026	28,571	71,429	0,5269	0,7823	4,3396	0,1803	
	B3	0,071	0,148	0,077	0,026	28,205	71,795	0,5353	0,8126	7,4843	0,1086	
	B4	0,074	0,149	0,075	0,025	27,473	72,527	0,5521	0,8770	6,8553	0,1279	
	B5	0,161	0,221	0,06	0,020	51,282	48,718	0,1744	1,4940	10,1258	0,1475	
Hipoksia 14 hr												
	D1	0,079	0,155	0,076	0,025	27,839	72,161	0,5437	0,8442	6,1006	0,1384	0,1537
	D2	0,067	0,131	0,064	0,021	23,443	76,557	0,6448	1,3335	10,7547	0,1240	
	D3	0,104	0,161	0,057	0,019	20,879	79,121	0,7038	1,7411	8,4277	0,2066	
	D4	0,078	0,141	0,063	0,021	23,077	76,923	0,6532	1,3853	8,9937	0,1540	
	D5	0,124	0,187	0,063	0,021	53,846	46,154	0,1231	1,3276	9,1195	0,1456	
Hipoksia 21 hari												
	E1	0,133	0,196	0,063	0,021	53,846	46,154	0,1231	1,3276	10,7547	0,1234	0,0965
	E2	0,12	0,195	0,075	0,025	64,103	35,897	-0,0821	0,8278	8,8050	0,0940	
	E3	0,134	0,207	0,073	0,024	62,393	37,607	-0,0479	0,8956	10,6918	0,0838	
	E4	0,13	0,203	0,073	0,024	62,393	37,607	-0,0479	0,8956	10,5660	0,0848	

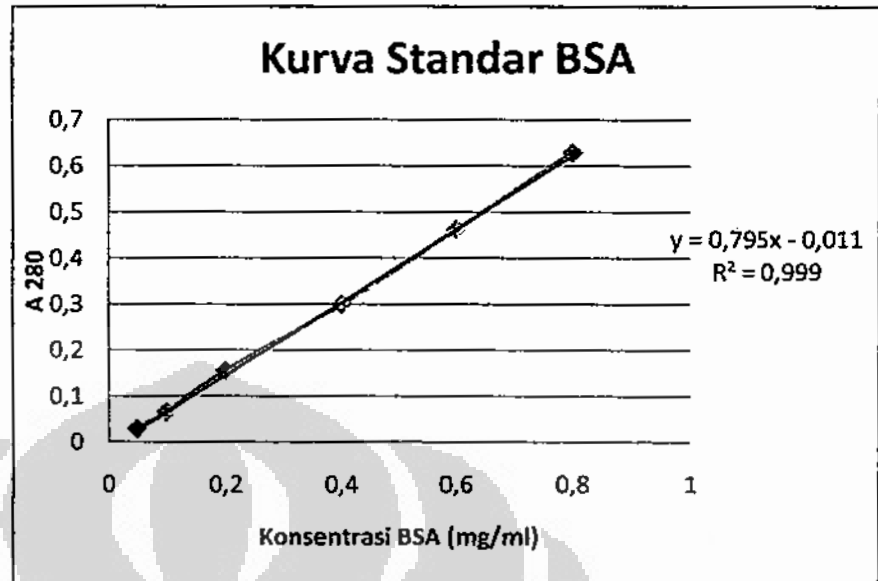
Aktivitas Spesifik MnSOD Jaringan Jantung

Sampel	A1	A2	ΔA	ΔA/mnt	% Inhibisi	Log Kons	Kons (U/ml)	Protein (mg/ml)	Kons (U/mg prot)	rata2	
Kontrol	C1	0,039	0,066	0,027	0,009	19,424	80,576	0,7372	5,4606	17,4843	0,3123
	C2	0,046	0,077	0,031	0,010	22,302	77,698	0,6711	4,6887	10,5660	0,4437
	C3	0,037	0,066	0,029	0,010	20,863	79,137	0,7041	5,0599	14,4654	0,3498
	C4	0,045	0,076	0,031	0,010	22,302	77,698	0,6711	4,6887	15,9748	0,2935
	C5	0,11	0,149	0,039	0,013	33,333	66,667	0,5333	3,4145	16,8553	0,2026
Hipoksia 1 hr	A1	0,065	0,11	0,045	0,015	32,374	67,626	0,4394	2,7504	15,3459	0,1792
	A2	0,068	0,105	0,037	0,012	26,619	73,381	0,5718	3,7305	12,7044	0,2936
	A3	0,068	0,112	0,044	0,015	31,655	68,345	0,4559	2,8572	14,0881	0,2028
	A4	0,078	0,118	0,04	0,013	28,777	71,223	0,5221	3,3276	15,2201	0,2186
	A5	0,139	0,18	0,041	0,014	35,043	64,957	0,4991	3,1561	16,9811	0,1659
Hipoksia 7 hr	B1	0,062	0,092	0,03	0,010	21,583	78,417	0,6876	4,8708	10,3145	0,4722
	B2	0,059	0,091	0,032	0,011	23,022	76,978	0,6545	4,5134	8,9308	0,5054
	B3	0,063	0,098	0,035	0,012	25,180	74,820	0,6049	4,0259	13,2075	0,3048
	B4	0,074	0,109	0,035	0,012	25,180	74,820	0,6049	4,0259	15,5975	0,2581
	B5	0,13	0,189	0,059	0,020	50,427	49,573	0,1915	1,5540	14,4654	0,1074
Hipoksia 14 hr	D1	0,055	0,078	0,023	0,008	16,547	83,453	0,8034	6,3595	12,3270	0,5159
	D2	0,071	0,088	0,017	0,006	12,230	87,770	0,9027	7,9929	19,6226	0,4073
	D3	0,079	0,098	0,019	0,006	13,669	86,331	0,8696	7,4065	12,3270	0,6008
	D4	0,069	0,086	0,017	0,006	12,230	87,770	0,9027	5,8929	17,3585	0,3395
	D5	0,117	0,147	0,03	0,010	25,641	74,359	0,6872	4,8661	17,4843	0,2783
Hipoksia 21 hari	E1	0,118	0,172	0,054	0,018	46,154	53,846	0,3053	2,0199	16,1006	0,1255
	E2	0,121	0,172	0,051	0,017	43,590	56,410	0,4267	2,6710	18,1132	0,1475
	E3	0,111	0,156	0,045	0,015	38,462	61,538	0,3707	2,3478	17,4843	0,1343
	E4	0,11	0,157	0,047	0,016	40,171	59,829	0,3987	2,5042	16,7296	0,1497

LAMPIRAN 6

Standar BSA

Kons BSA (mg/ml)	A280
0,8	0,629
0,6	0,462
0,4	0,299
0,2	0,155
0,1	0,065
0,05	0,029



Kadar protein lisat darah (pengenceran 20x)

Sampel		A 280	Kons	Kons (mg/ml)
Kontrol	C1	0,080	0,114	2,289
	C2	0,096	0,135	2,692
	C3	0,136	0,185	3,698
	C4	0,102	0,142	2,843
	C5	0,117	0,161	3,220
Hipoksia 1 hr	A1	0,087	0,123	2,465
	A2	0,104	0,145	2,893
	A3	0,135	0,184	3,673
	A4	0,143	0,194	3,874
	A5	0,203	0,269	5,384
Hipoksia 7 hr	B1	0,097	0,136	2,717
	B2	0,129	0,176	3,522
	B3	0,088	0,125	2,491
	B4	0,135	0,184	3,673
	B5	0,149	0,201	4,025
Hipoksia 14 hr	D1	0,107	0,148	2,969
	D2	0,098	0,137	2,742
	D3	0,098	0,137	2,742
	D4	0,115	0,158	3,170
	D5	0,201	0,267	5,333
Hipoksia 21 hr	E1	0,122	0,167	3,346
	E2	0,115	0,158	3,170
	E3	0,132	0,180	3,597
	E4	0,112	0,155	3,094

Kadar protein homogenat otak (pengenceran 50x)

Sampel		A 280	Kons	Kons (mg/ml)
Kontrol	C1	0,168	0,225	11,258
	C2	0,123	0,169	8,428
	C3	0,129	0,176	8,805
	C4	0,107	0,148	7,421
	C5	0,193	0,257	12,830
Hipoksia 1 hr	A1	0,063	0,093	4,654
	A2	0,058	0,087	4,340
	A3	0,069	0,101	5,031
	A4	0,057	0,086	4,277
	A5	0,146	0,197	9,874
Hipoksia 7 hr	B1	0,056	0,084	4,214
	B2	0,058	0,087	4,340
	B3	0,108	0,150	7,484
	B4	0,098	0,137	6,855
	B5	0,150	0,203	10,126
Hipoksia 14 hr	D1	0,086	0,122	6,101
	D2	0,160	0,215	10,755
	D3	0,123	0,169	8,428
	D4	0,132	0,180	8,994
	D5	0,134	0,182	9,119
Hipoksia 21 hr	E1	0,160	0,215	10,755
	E2	0,129	0,176	8,805
	E3	0,159	0,214	10,692
	E4	0,157	0,211	10,566

Kadar protein homogenat jantung (pengenceran 100x)

Sampel		A 280	Kons	Kons (mg/ml)
Kontrol	C1	0,128	0,175	17,484
	C2	0,073	0,106	10,566
	C3	0,104	0,145	14,465
	C4	0,116	0,160	15,975
	C5	0,123	0,169	16,855
Hipoksia 1 hr	A1	0,111	0,153	15,346
	A2	0,090	0,127	12,704
	A3	0,101	0,141	14,088
	A4	0,110	0,152	15,220
	A5	0,124	0,170	16,981
Hipoksia 7 hr	B1	0,071	0,103	10,314
	B2	0,060	0,089	8,931
	B3	0,094	0,132	13,208
	B4	0,113	0,156	15,597
	B5	0,104	0,145	14,465
Hipoksia 14 hr	D1	0,087	0,123	12,327
	D2	0,145	0,196	19,623
	D3	0,087	0,123	12,327
	D4	0,127	0,174	17,358
	D5	0,128	0,175	17,484
Hipoksia 21 hr	E1	0,117	0,161	16,101
	E2	0,133	0,181	18,113
	E3	0,128	0,175	17,484
	E4	0,122	0,167	16,730

LAMPIRAN 7. HASIL ANALISIS UJI STATISTIK

1. Hasil analisis uji T nilai aktivitas spesifik MnSOD

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_drh	kontrol	5	,125249	,0189162	,0084596
	hipoksia 1 hr	5	,086194	,0231598	,0103574

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_drh	Equal variances assumed	,359	,566	2,920	8	,019	,0390548	,0133731	,0082164	,0698933
	Equal variances not assumed			2,920	7,693	,020	,0390548	,0133731	,0080011	,0701086

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_drh	kontrol	5	,125249	,0189162	,0084596
	hipoksia 7 hr	5	,124031	,0253289	,0113274

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_drh	Equal variances assumed	,374	,558	,086	8	,933	,0012178	,0141377	,0313838	,0338195
	Equal variances not assumed			,086	7,403	,934	,0012178	,0141377	,0318470	,0342826

Universitas Indonesia

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_drh	kontrol	5	,125249	,0189162	,0084596
	hipoksia 14 hr	5	,121807	,0142457	,0063709

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_drh	Equal variances assumed	1,105	,324	,325	8	,754	,0034413	,0105902	-,0209798	,0278623
	Equal variances not assumed			,325	7,433	,754	,0034413	,0105902	-,0213080	,0281905

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_drh	kontrol	5	,125249	,0189162	,0084596
	hipoksia 21 hr	4	,219414	,0190444	,0095222

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_drh	Equal variances assumed	,031	,865	7,399	7	,000	-,0941654	,0127263	-,1242584	,0640724
	Equal variances not assumed			7,393	6,546	,000	-,0941654	,0127372	-,1247128	,0636180

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_otak	kontrol	5	,080736	,0069111	,0030907
	hipoksia 1 hr	5	,133660	,0312188	,0139615

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_otak	Equal variances assumed	6,040	,039	3,701	8	,006	,0529246	,0142995	,0858992	,0199499
	Equal variances not assumed			3,701	4,391	,018	,0529246	,0142995	,0912698	,0145794

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_otak	kontrol	5	,080736	,0069111	,0030907
	hipoksia 7 hr	5	,140236	,0265536	,0118751

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_otak	Equal variances assumed	2,801	,133	5,053	8	,001	,0729822	,0144436	,1062892	,0396752
	Equal variances not assumed			5,053	4,383	,006	,0729822	,0144436	,1117391	,0342253

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_otak	kontrol	5	,080736	,0069111	,0030907
	hipoksia 21 hr	4	,096500	,0185472	,0092736

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
										Lower	Upper
akt_mnsod_otak	Equal variances assumed	2,829	,136	1,778	7	,119	,0157648	,0088671	-,0367321	,0052025	
	Equal variances not assumed			1,613	3,670	,188	,0157648	,0097751	-,0438965	,0123669	

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_jtg	kontrol	5	,320388	,0876779	,0392108
	hipoksia 1 hr	5	,216033	,0460156	,0205788

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
										Lower	Upper
akt_mnsod_jtg	Equal variances assumed	1,094	,326	2,357	8	,046	,1043550	,0442829	,0022385	,2064714	
	Equal variances not assumed			2,357	6,048	,056	,1043550	,0442829	-,0037925	,2125025	

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_jtg	kontrol	5	,320388	,0876779	,0392108
	hipoksia 7 hr	5	,329592	,1630361	,0729120

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
akt_mnsod_jtg	Equal variances assumed	2,355	,163	,111	8	,914	-,0092038	,0827867	,2001103	,1817027
	Equal variances not assumed			,111	6,135	,915	-,0092038	,0827867	,2106993	,1922916

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_jtg	kontrol	5	,320388	,0876779	,0392108
	hipoksia 14 hr	5	,428372	,1306381	,0584231

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
akt_mnsod_jtg	Equal variances assumed	1,400	,271	1,535	8	,163	-,1079835	,0703615	,2702375	,0542705
	Equal variances not assumed			1,535	6,996	,169	-,1079835	,0703615	,2743827	,0584157

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
akt_mnsod_jtg	kontrol	5	,320388	,0876779	,0392108
	hipoksia 21 hr	4	,139221	,0114202	,0057101

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
akt_mnsod_jtg	Equal variances assumed	3,438	,106	4,049	7	,005	,1811673	,0447428	,0753674	,2869672
	Equal variances not assumed			4,572	4,169	,009	,1811673	,0396244	,0728887	,2894459

2. Hasil analisis uji korelasi Pearson tingkat ekspresi relatif mRNA MnSOD dan aktivitas spesifik MnSOD

Correlations

		tk_ekspresi_mnsod_drh	akt_mnsod_drh
tk_ekspresi_mnsod_drh	Pearson Correlation	1	-,250
	Sig. (2-tailed)		,685
	N	5	5
akt_mnsod_drh	Pearson Correlation	-,250	1
	Sig. (2-tailed)	,685	
	N	5	5

Correlations

		tk_ekspresi_mnsod_drh	akt_mnsod_drh
tk_ekspresi_mnsod_drh	Pearson Correlation	1	,616
	Sig. (2-tailed)		,384
	N	4	4
akt_mnsod_drh	Pearson Correlation	,616	1
	Sig. (2-tailed)	,384	
	N	4	4

Correlations

		tk_ekspresi_ mnsod_otak	akt_mnsod_ otak
tk_ekspresi_mnsod_otak	Pearson Correlation	1	,528
	Sig. (2-tailed)		,361
	N	5	5
akt_mnsod_otak	Pearson Correlation	,528	1
	Sig. (2-tailed)	,361	
	N	5	5

Correlations

		tk_ekspresi_ mnsod_jtg	akt_ mnsod_jtg
tk_ekspresi_mnsod_jtg	Pearson Correlation	1	-,618
	Sig. (2-tailed)		,266
	N	5	5
akt_mnsod_jtg	Pearson Correlation	-,618	1
	Sig. (2-tailed)	,266	
	N	5	5

Correlations

		tk_ekspresi_ mnsod_jtg	akt_ mnsod_jtg
tk_ekspresi_mnsod_jtg	Pearson Correlation	1	,943
	Sig. (2-tailed)		,057
	N	4	4
akt_mnsod_jtg	Pearson Correlation	,943	1
	Sig. (2-tailed)	,057	
	N	4	4

3. Hasil analisis uji korelasi Pearson ekspresi MnSOD darah dengan ekspresi MnSOD jantung dan otak

Correlations

		tk_ekspresi_ mnsod_otak	tk_ekspresi_ mnsod_drh
tk_ekspresi_mnsod_otak	Pearson Correlation	1	,551
	Sig. (2-tailed)		,336
	N	5	5
tk_ekspresi_mnsod_drh	Pearson Correlation	,551	1
	Sig. (2-tailed)	,336	
	N	5	5

Correlations

		tk_ekspresi_ mnsod_drh	tk_ekspresi_ mnsod_jtg
tk_ekspresi_mnsod_drh	Pearson Correlation	1	,605
	Sig. (2-tailed)		,280
	N	5	5
tk_ekspresi_mnsod_jtg	Pearson Correlation	,605	1
	Sig. (2-tailed)	,280	
	N	5	5

Correlations

		akt_mnsod_ otak	akt_mnsod_ drh
akt_mnsod_otak	Pearson Correlation	1	,317
	Sig. (2-tailed)		,604
	N	5	5
akt_mnsod_drh	Pearson Correlation	,317	1
	Sig. (2-tailed)	,604	
	N	5	5

Correlations

		akt_mnsod_ drh	akt_ mnsod_jtg
akt_mnsod_drh	Pearson Correlation	1	,896*
	Sig. (2-tailed)		,039
	N	5	5
akt_mnsod_jtg	Pearson Correlation	,896*	1
	Sig. (2-tailed)	,039	
	N	5	5

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN



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

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

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE)

Nomor : LB.03.02/KE/1347/2008

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

**"PERAN PROTEIN *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 α* (HIF-1 α) TERHADAP REGULASI GEN *MANGANESE-SUPEROXIDE DISMUTASE* (MnSOD) PADA KEADAAN HIPOKSIA SISTEMIK "
(Revisi protocol tanggal 8 Mei 2008)**

yang menggunakan / memanfaatkan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama:

Dr.rer.physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protocol penelitian.

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

Jakarta, 13 Mei 2008

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo

Specific activity of manganese superoxide dismutase in rat heart, brain and blood during induced systemic hypoxia

Septelia Inawati Wanandi¹, Syarifah Dewi^{1,2}, Reni Paramita¹, Frans Ferdinal³, Sri Widia A Jusman¹, Mohammad Sadikin¹

Abstract

Hypoxia results in an increased generation of reactive oxygen species (ROS), especially superoxide anion. The accumulation of ROS could lead to the oxidative damage of cell macromolecules. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) as a major endogenous antioxidant enzyme in mitochondrial matrix, could convert superoxide radicals to hydrogen peroxide, hence prevents the cell oxidative damage. The aim of this study is to determine the specific activity of MnSOD enzyme in rat heart, brain and blood during induced systemic hypoxia. This experimental study uses 25 male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups and subjected to systemic hypoxia by placing them in the hypoxic chamber supplied by 8-10% of O₂ for 0, 1, 7, 14 and 21 days, respectively. The MnSOD enzyme specific activity was biochemically determined using RanSOD® kit. Specific activity of MnSOD in rat heart and blood cells under early hypoxic induction (1 day) were significantly lower than the one in control group ($p < .05$). However, after 1 day of hypoxic induction this level was then increased, and again decreased significantly compared to the control ($p < .01$) under very late hypoxic condition (21 days). Contrastly, the level of MnSOD specific activity in brain cells was significantly increased since early systemic hypoxia (day 1) up to day 14 ($p < .01$), but under late hypoxic condition (day 21) the activity also tends to decrease although statistically it was not significant compared to the normal condition. We could conclude that the expression of MnSOD enzyme in different tissues as well as at different stages (early and late) of induced systemic hypoxia was distinctly regulated.

Keywords: hypoxia, ROS, specific activity of MnSOD.

Hypoxia is a pathological condition in which the body as a whole or region of the body is deprived of adequate oxygen supply. This condition threatens life of cells or organisms. The ability to maintain oxygen homeostasis is essential to the survival of all species. Oxygen homeostasis mechanisms can occur at systemic level and cellular level such as by oxygen sensing.^{1,2} At systemic level, low oxygen could stimulate heart rate, peripheral vasodilatation and hyperventilation, whereas at cellular level, anaerobic metabolic pathways would be activated.^{3,4}

Nowadays, the pattern diseases have been shifted, from infectious to degenerative diseases such as cardiovascular, cerebrovascular diseases and cancer. This occurs because of the lifestyle changing that have risk factors to stimulate the degeneration

diseases. Almost all risk factors could induce hypoxic condition which is involved in pathogenesis some degenerative diseases, especially ischemic diseases such as myocard infarction, stroke, cancer, chronic obstructive pulmonary disease and acute renal failure.⁵

Hypoxia results in an increased generation of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide (O₂⁻) and

hydrogen peroxide (H₂O₂) in mitochondria. ROS is free radical molecule that have electron unpaired at oxygen molecule and very reactive. ROS participate at signal transduction pathway in hypoxia and involve in HIF-1 α stabilization. Under hypoxic condition, the consumption of oxygen at cytochrome c oxidase (mitochondrial complex IV) is lower and electrons accumulate at preceding complexes (mitochondrial complex III). Such an accumulation leads to increased generation of ROS at complex III.⁶ High level of ROS induces HIF-1 α stabilization, whereas low levels lead to HIF-1 α degradation. ROS inhibition in hypoxic condition, can inhibit activation of genes that induced hypoxia. Beside that, oxidant treatment at normoxic cells can activate genes that induced hypoxia.^{4,7}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

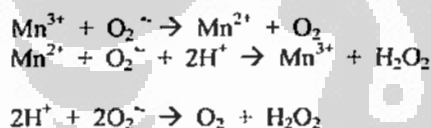
² Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

³ Doctorate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

Superoxide dismutase (SOD) is one of antioxidant enzymes that protect cell from oxidative damage. This enzyme converts anion superoxide ($O_2^{\cdot -}$) that very reactive to hydrogen peroxide (H_2O_2) that less reactive. Further hydrogen peroxide is detoxified become water by catalase enzyme and glutation peroxidase.⁸

Superoxide dismutase found in all aerobic organisms. This enzyme contain metal ion (Fe, Ni, Cu, Zn, Mn) at catalytic site, and also called metalloenzyme. There are three isoform of SOD in eukaryotic cells, i.e. Cu/ZnSOD, extracellular SOD (EC-SOD) and MnSOD (Manganese-Superoxide Dismutase). CuZnSOD (copper-zinc SOD) or known as SOD 1, located in cytoplasm and contribute the highest of total activity of SOD (70-80% from total cellular SOD). MnSOD (manganese superoksida dismutase) or known as SOD 2, located in mitochondria with activity about 10-20% from total cellular SOD. ECSOD (extracellular SOD) or known as SOD 3, located in extracellular fluid.^{9,10}

MnSOD is the major antioxidant enzyme that scavenge superoxide radical, because electron transport chain in mitochondria is the major ROS production.¹⁰ MnSOD neutralize anion superoxide by two step dismutase reaction. At this process, Mn^{3+} is reduced and then oxidized:⁸



Decreasing the MnSOD level could elevate ROS level in mitochondria, leading to oxidative stress including oxidative damage in biomacromolecules, such as protein, lipid and DNA.¹¹

Many studies have explained the important role of MnSOD on the prevention of oxidative stress.^{12,13} However, little is known about the expression of MnSOD during systemic hypoxic induction, particularly in the essential tissues, such as brain, heart and blood. In this present study, the specific activity of MnSOD enzyme were biochemically determined. The information about differential MnSOD expression in hypoxic tissues would open the new paradigm of localized antioxidant protection

METHODS

This study was an experimental study carried out at Biochemistry and Molecular Biology Laboratory,

Faculty of Medicine University of Indonesia within 10 months (July 2007 – April 2008). Twenty five male Sprague Dawley rats (6-8 weeks old; body weight 150-200 g at entry into protocol) were randomly divided into 5 groups (n = 5 per group). Rats were subjected to systemic hypoxia by placing them into the normobaric hypoxic chamber supplied with 8-10% of O_2 for 0 (control rats without hypoxia), 1, 7, 14 and 21 days, respectively. All rats had free access to water and standard rat chow. Water and food consumption was assessed every 2 days. Hypoxic chamber was designed as described by Corno et al. (2002).¹⁴ Procedures followed were approved by Research and Development Committee, Health Department of Republic Indonesia (*Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI*; no. LB.03.02/KE/1347/2008).

After hypoxic treatment, rats were anesthetized with CCl_4 . Blood samples were immediately collected for blood gas analysis, as well as for the specific activity of MnSOD assay. Subsequently, tissue samples (brain and heart) were rapidly excised for the specific activity of MnSOD assay. All the procedures were done in the hypoxic chamber.

Tissue samples (100 mg) were homogenized in 1 mL phosphate buffer solution (PBS; pH 7.0) and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. The supernatant was collected and kept at $-20^{\circ}C$ before use. Whole blood (200 μ l) was added into 600 μ l of red blood cell lysis solution (Promega). The mixture was incubated for 10 minutes in room temperature and centrifuged at 16000 rpm for 20 seconds. The white pellet containing leucocyte cells was collected and lysis with 200 μ l of nuclei lysis solution (Promega). Lysates were diluted 5 times with PBS and kept at $-20^{\circ}C$ before use.

The MnSOD enzyme specific activity was biochemically determined using RanSOD® kit. To inhibit the Cu/ZnSOD, firstly natrium cyanide (5 mM) was added into each sample and the mixture was incubated for 5 minutes in room temperature. Xantin oxidase was then added into the mixture, followed by the measurement of light absorbance using spectrophotometer at 505 nm after 30 seconds and 3 minutes. The activity was calculated as a percentage inhibition of the samples plotted to the standard curve, using these following formulas:

$$\frac{A2 - A1}{3} = \Delta A/\text{min of standard or sample} \quad (1)$$

A2 = Absorbance at 3 minutes after incubation with xantin oxidase
 A1 = Absorbance at 30 seconds after incubation with xantin oxidase

$$\% \text{ inhibition} = \frac{100 - (\Delta A_{\text{std or samples}}/\text{min} \times 100)}{(\Delta A_{\text{SI}}/\text{min})} \quad (2)$$

Sample diluent rate (S1) = rate of uninhibited reaction = 100 %

The specific activity of MnSOD enzyme was calculated as enzyme activity determined above per mg protein. Protein concentration was measured using spectrophotometer at 280 nm and plotted to the BSA (Bovine Serum Albumin) standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study exposure to normobaric systemic hypoxia induced profound changes in the blood oxygen transport characteristics, such as decreased of paO_2 , hematocrit and hemoglobin values (data not shown). These values are a wellknown consequence of increased hypoxia-induced erythropoietin production.¹⁴

Determination of the MnSOD specific activity in rat blood and heart cells (Fig. 1A and B) under early hypoxic induction (1 day) resulted in the significantly lower levels of MnSOD specific activity compared to the level in control group (t test; $p < .05$). This suggests that the cells at early hypoxia have not enough time to provide more MnSOD enzyme through gene expression to eliminate the sudden accumulation of ROS. However, after 1 day of hypoxic induction this level was then increased, and again decreased significantly under very late hypoxic condition compared to the control (t test; $p < .01$).

In contrast to the results in heart and blood cells, the level of MnSOD specific activity in brain cells (Fig. 1C) were demonstrated to be significantly increased since early systemic hypoxia (day 1) up to day 14 (t test; $p < .01$). Indeed, the phenomena occurred in heart and blood cells under late hypoxic condition (day 21) was also found in brain which shown that the activity tends to decrease although statistically it was not significant compared to the normal condition.

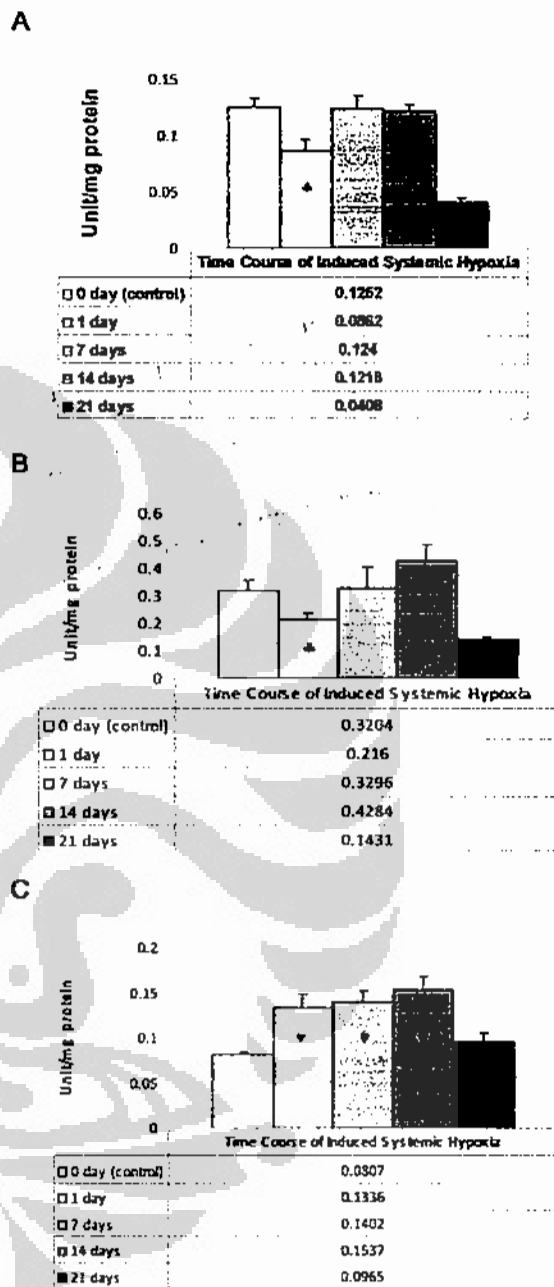


Figure 1. Specific activity of MnSOD in rat blood (A), heart (B) and brain (C) during induced systemic hypoxia.

- ♥ = significantly different compared to the control (t test; $p < .01$)
 + = significantly different compared to the control (t test; $p < .05$)

the lower level than in normal condition as found in blood and heart cells. The similar result could also be shown by the analysis of mRNA expression of MnSOD using the same samples (data not shown).

The increase of MnSOD activity seems to be one of the cell adaptive responses - instead of HIF-1 α stabilization - through antioxidant mechanism against the accumulation of ROS during induced systemic hypoxia. Schumacker (2003) has reported that hypoxia could stimulate ROS production in the mitochondria and regulate transcription and post-transcription responses against low level of oxygen.¹⁵

This study could demonstrate that brain cells have different pattern of MnSOD specific activity compared to blood and heart cells during several time points of hypoxic induction, particularly at early stage. It should also be considered that the levels of MnSOD specific activity in each tissue were distinct although measured under the same condition. This indicates that the antioxidant response in brain, heart and blood cells have different sensitivity and efficiency, depending on the amount of ROS accumulation.

CONCLUSION

Taken together all the results, we could conclude that the expression of MnSOD enzyme in different tissues as well as at different stages (early and late) of induced systemic hypoxia were distinctly regulated. Furthermore, it seems that brain tissue could better survive from induced systemic hypoxia than heart and blood cells, due to earlier antioxidant response through MnSOD activity. Further studies are required to elaborate the MnSOD specific activity in other cells during induced systemic hypoxia, as well as to analyze the correlation between MnSOD expression and cell death.

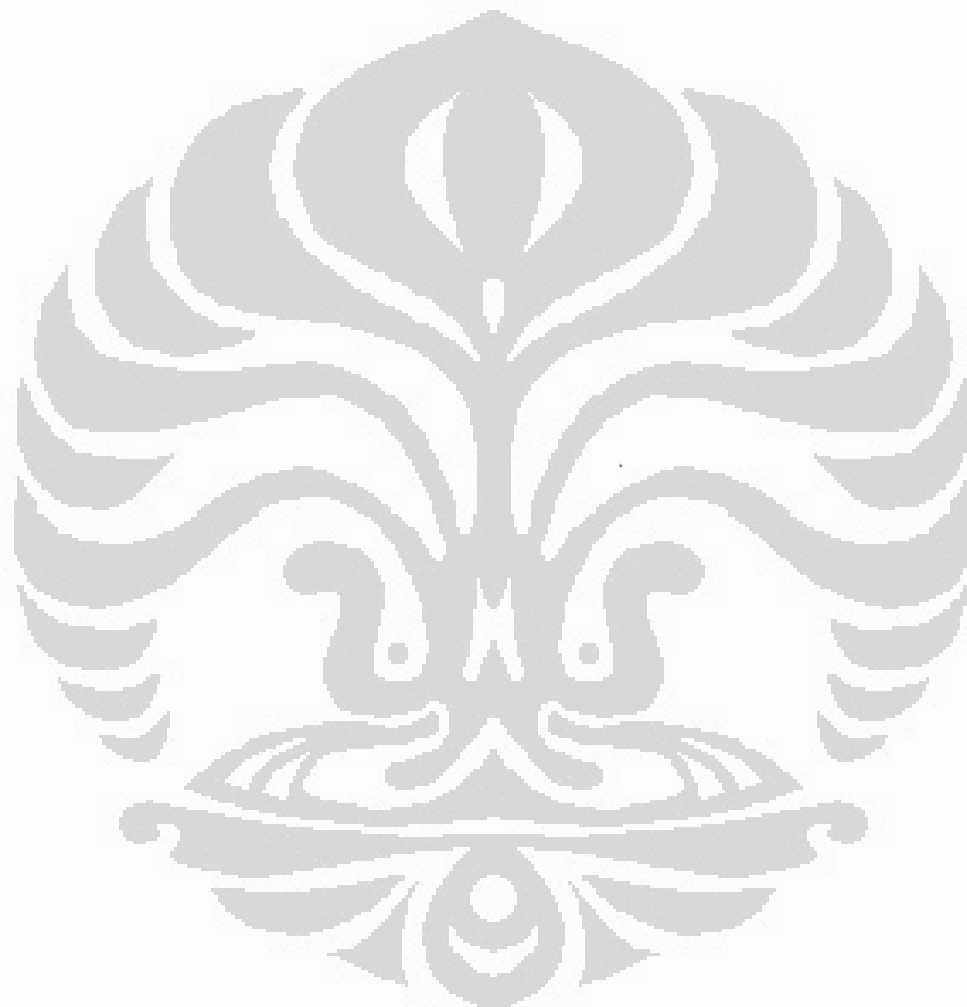
ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by *Riset Unggulan Universitas Indonesia* 2007. The authors would like to thank dr. Frans Ferdinal, MS for kindly providing us with the hypoxic chamber and to dr. Novi Silvia and Ondi Sutisna for excellent technical support.

REFERENCES

1. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88:1474-80
2. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol*. 2004;164:1875-82.
3. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res*. 2002;3:1-27
4. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* 2004;51(3):563-85
5. Dong Z, Venkatachalam MA. Apoptosis in ischemic disease. In: Yin XM, Dong Z, ed. In: *Essentials of apoptosis: a guide for basic and clinical research*. New Jersey. Humana Press Inc, 2003:225-36.
6. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:11715-20.
7. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Gene & Development* 2004;18:2183-94
8. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London. Oxford University Press. 2007:79-95.
9. Skrzycki M, Czeczot H. Superoxide dismutase as a potential therapeutic agent. *Adv Clin Exp Med* . 2007;16(4):561-8.
10. Martin RCG, et al. Manganese superoxide dismutase gene coding region polymorphisms lack clinical incidence in general population. *DNA and Cell Biol*. 2008;27(6):321-3.
11. Li et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995;11:376-81.
12. Lebovitz, RM et al. Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial SOD-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9782.

12. Lebovitz, RM et al. Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial SOD-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9782.
13. Kokoszka JE, et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod 2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2278.
14. Corno AF et al. Chronic hypoxia: A model for cyanotic congenital heart defects. *J Thorax Cardiovasc Surg*. 2002;124:105-12.
15. Schumacker PT. Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol*. 2003;543:57-71.





BIODATA PENULIS

Nama : Syarifah Dewi
Tempat/Tanggal lahir : Singaraja/24 Januari 1980
Alamat : Jl. Celepuk I Komp. Perdagangan No.5 Rt 01/Rw 12,
Jatimakmur, Pondok Gede, Bekasi
Agama : Islam
Pekerjaan : Staf pengajar Dept. Biokimia & Biologi Molekuler FKUI
Riwayat pendidikan :
- Pendidikan Profesi Dokter FKUI, tahun 2002-2004
- S1 Kedokteran FKUI, tahun 1998-2002
- SMUN 2 Tangerang, tahun 1995-1998
- SLTPN 2 Tangerang, tahun 1992-1995
- SDN Tangerang 2, tahun 1986-1992
- TK Trisula Tangerang, 1985-1986
Pengalaman penelitian:
1. Polimorfisme gen manganese superoksida dismutase pada penderita retinoblastoma
2. Polimorfisme gen manganese superoksida dismutase pada populasi normal di Jakarta
Sumber dana penelitian : Program Unggulan RUUI 2007

Penulis

Syarifah Dewi