

**EKSPRESI GEN *MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE*
(*MnSOD*) PADA SEL GLIOMA MANUSIA: TINJAUAN
KHUSUS PADA HIPOKSIA SEL TUMOR**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Biomedik**

**NOVI SILVIA HARDIANY
NPM 0706170753**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BIOKIMIA
JAKARTA
DESEMBER 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 : Novi Silvia Hardiany

NPM : 0706170753

Tanda Tangan :



Tanggal : 12 Desember 2008

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Novi Silvia Hardiany
NPM : 0706170753
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Ekspresi gen manganese superoksida dismutase
(MnSOD) pada sel glioma manusia: Tinjauan khusus
pada hipoksia sel tumor

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

Pembimbing II: Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc

Penguji : dr. Sri Widia A.Jusman, MS

Penguji : Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD

Penguji : Ahmad R. Utomo, PhD

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Desember 2008

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI :
Dr.rer. physiol. dr. 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 sel glioma manusia: Tinjauan khusus pada hipoksia sel tumor”. 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 Prof. dr. Mohamad Sadikin, Dsc. 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.

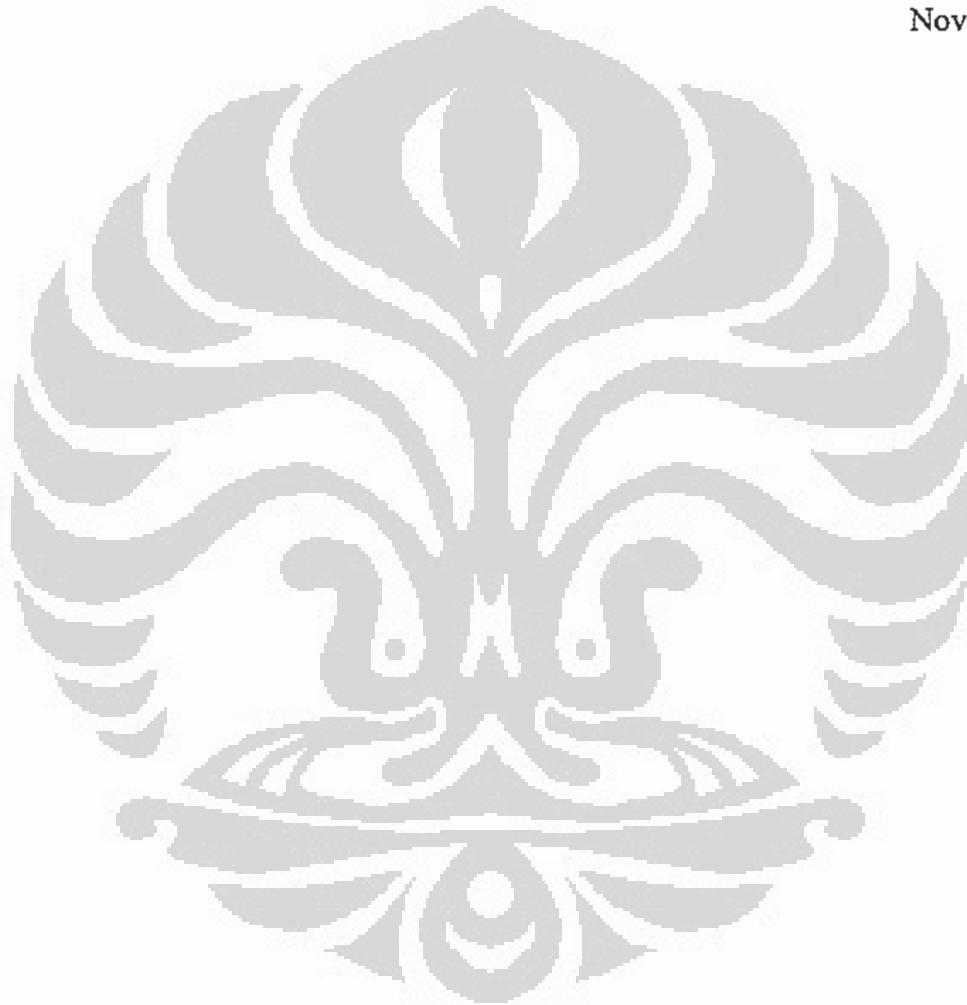
Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Badan Penelitian & Pengembangan Kesehatan Depkes RI yang telah memberikan bantuan dana penelitian ini melalui program RISBIN IPTEKDOK 2007. Tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada teman-teman sejawat dr. Wawan Mulyawan, SpBS (RUSPAU); dr. Renindra Ananda Aman, SpBS (RSCM); dr. Agus Yuniarto, SpBS (RSPAD); dr. Syamsu Azhari, SpBS (RSKD) yang telah membantu penulis dalam mengumpulkan sampel dari pasien glioma.

Terima kasih juga kepada dr. Sri Widia A. Jusman, MS selaku ketua Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI, dr. Ani Retno Prijanti, MS selaku ketua kekhususan Biokimia serta seluruh staf pengajar dan staf administrasi di PMIB FKUI, khususnya 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 tercinta, yang selalu mendampingi saat susah maupun senang dan selalu memberi semangat, orang tua serta kakak yang selalu memberikan doa dan

restu, penulis mengucapkan banyak terima kasih. Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada para pasien penderita glioma yang telah suka rela berpartisipasi dalam penelitian ini, semoga mereka dapat terus menjalani kehidupan dan mencapai cita-cita yang diharapkan.

Jakarta, Desember 2008

Novi Silvia Hardiany



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

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

Nama : Novi Silvia Hardiany
NPM : 0706170753
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 superoksida dismutase (MnSOD) pada sel glioma manusia: Tinjauan khusus pada hipoksia sel tumor

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 : Desember 2008
Yang menyatakan



Novi Silvia Hardiany

ABSTRAK

Nama : Novi Silvia Hardiany
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Ekspresi Gen *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)* pada Sel Glioma Manusia: Tinjauan Khusus pada Hipoksia Sel Tumor

Latar Belakang: Glioma merupakan tumor otak primer yang sering ditemukan di Indonesia. Sampai saat ini, terapi glioma belum memuaskan karena sering timbul resistensi dan rekurensi sehingga diperlukan terapi tambahan misalnya terapi gen. MnSOD diduga berperan sebagai supresor tumor, namun peran tersebut masih kontroversial. Tumor padat termasuk glioma mempunyai status oksigen yang kurang baik dibandingkan dengan jaringan normal. MnSOD sebagai antioksidan dapat mempengaruhi kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang meningkat pada kondisi hipoksia. Oleh karena itu perlu dianalisis bagaimana ekspresi gen MnSOD pada sel glioma manusia yang hipoksia. Hipoksia pada sel glioma diduga mempengaruhi respon sel tumor terhadap terapi radiasi. Hipoksia tersebut dapat dideteksi dengan suatu petanda jaringan hipoksia yaitu HIF-1 α .

Tujuan: Untuk menganalisis ekspresi gen MnSOD, kondisi hipoksia pada sel glioma melalui analisis ekspresi gen HIF-1 α serta menganalisis ekspresi gen MnSOD pada sel glioma yang hipoksia.

Desain: *Cross Sectional*

Metode: Ekspresi gen MnSOD dianalisis dengan membandingkan level mRNA dan aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sel glioma dengan sel leukosit (kontrol). Ekspresi gen HIF-1 α dianalisis dengan membandingkan level mRNA HIF-1 α pada sel glioma dengan sel leukosit. Ekspresi MnSOD dan HIF-1 α dideteksi pada 20 pasien glioma menggunakan *quantitative Real Time RT-PCR* untuk kadar relatif mRNA MnSOD dan HIF-1 α , serta pemeriksaan biokimia untuk mengukur aktivitas enzim MnSOD. Analisis statistik dengan menggunakan SPSS 16.0.

Hasil: Ekspresi gen MnSOD baik mRNA maupun aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sebagian besar sampel sel glioma manusia ditemukan lebih rendah secara signifikan ($p < 0.01$) dibandingkan dengan sel leukosit. Sedangkan mRNA HIF-1 α pada sebagian besar sel glioma manusia ditemukan lebih tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan dengan sel leukosit. Sebanyak 80 % (16 sampel) menunjukkan mRNA HIF-1 α yang tinggi, yang berarti terdapat hipoksia pada sel glioma. Dari 16 sampel tersebut, 11 sampel menunjukkan ekspresi mRNA MnSOD yang rendah dan 4 sampel menunjukkan ekspresi mRNA MnSOD yang tinggi.

Kesimpulan: Ekspresi gen MnSOD pada sebagian besar sampel ditemukan rendah. Ekspresi HIF-1 α yang tinggi menunjukkan terdapat hipoksia pada sebagian besar sampel sel glioma. Terdapat perbedaan ekspresi MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma.

Kata Kunci:

MnSOD, HIF-1 α , hipoksia, glioma

ABSTRACT

Name : Novi Silvia Hardiany
Study Program : Biomedical Science
Title : Gene Expression of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) in Human Glioma Cells: Special Focus on Hypoxia of Tumor Cells.

Background: Glioma is one of the most frequently found primary brains tumors in Indonesia. Until now, treatment of the glioma is far from succesfull due to resistancy and recurrence. Therefore, additional therapy is required, such as gene therapy. MnSOD is antioxidant enzymes which is suggested as tumor suppressor, despite its controversies. Solid tumor such as glioma have low oxygen level in the tissue compare to normal tissues. MnSOD as antioxidant enzyme have potential effects on increased ROS (reactive oxygen species) concentration in hypoxia condition. Therefore, further analysis is needed to explain MnSOD gene expression in hypoxic human gliomal cells. Hypoxia in gliomal cells are suggested to influence tumor cells responses toward radiotherapy. Hypoxia state can be detected using tissues hypoxic marker, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α).

Desaign: Cross sectional

Aim: To analyzed MnSOD gene expression, hypoxia condition in human glioma cells by analyzing the gene expression of HIF-1 α and to analyzed MnSOD gene expression in hypoxic human gliomal cells.

Method: MnSOD gene expression was analyzed by comparing MnSOD mRNA level and enzyme specific activity in glioma cells with leucocytes (control). HIF-1 α gene expression was analyzed by comparing HIF-1 α mRNA level in glioma cells with leucocytes. Twenty glioma patients were included in this study. Quantitative Real Time RT-PCR was used to analyzed MnSOD and HIF-1 α mRNA level. Biochemistry test was used to analyzed MnSOD enzyme spesific activity. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0.

Results: MnSOD gene expression at mRNA level and enzyme spesific actvity in most human glioma samples were significantly lower ($p < .01$) than leucocytes. While HIF-1 α mRNA level in most human glioma samples were significantly higher ($p < .05$) than leucocytes. Eighty percents (16) of the samples showed high HIF-1 α mRNA level, this mean that glioma samples were in hypoxic state. Among the 16 samples, 11 samples showed low MnSOD mRNA level and 4 samples showed high mRNA MnSOD level. This mean that there were differences in MnSOD gene expression in hypoxic human glioma cells.

Conclusion: MnSOD gene expression in most human glioma samples were low. High HIF-1 α mRNA level were found in most of glioma samples, meaning that glioma sample were in hypoxic state. There were differences in MnSOD expression in hypoxic human glioma cells.

Keywords:

MnSOD, HIF-1 α , hypoxia, glioma

DAFTAR ISI

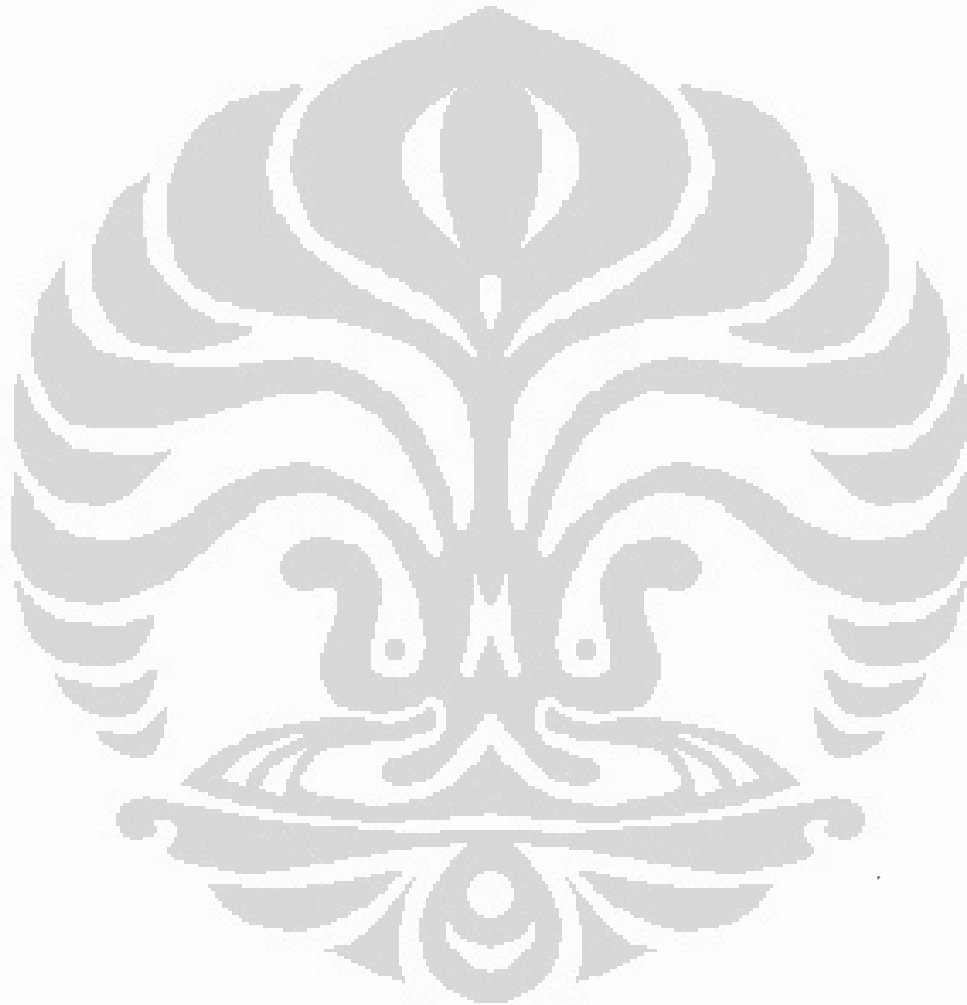
HALAMAN JUDUL	I
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Pertanyaan Penelitian	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Glioma.....	6
2.1.1. Klasifikasi Glioma.....	6
2.1.2. Gejala Klinis Glioma	8
2.1.3. Diagnosis Glioma	8
2.1.4. Terapi Glioma	9
2.2. <i>Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)</i>	10
2.2.1. Ekspresi Gen MnSOD	10
2.2.2. Struktur Protein MnSOD	11
2.2.3. Peran MnSOD sebagai Antioksidan	12
2.2.4. Efek Biologi MnSOD	14
2.2.5. Peran MnSOD sebagai Supresor Tumor	15
2.2.6. Terapi Gen MnSOD	17
2.3. Hipoksia pada Kanker	19
2.3.1. Mekanisme Hipoksia pada Kanker	19
2.3.2. Implikasi Klinis	21
2.4. <i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>	22
2.4.1. Struktur HIF-1	22
2.4.2. Degradasi HIF-1 α	23
2.4.3. Aktivasi HIF-1 α	24
2.4.4. Ekspresi HIF-1 α pada Kanker	26
2.5. Real Time PCR.....	27

BAB III. METODE PENELITIAN.....	31
3.1. Disain Penelitian.....	31
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.3. Subyek Penelitian	31
3.4. Sampel Penelitian	31
3.5. Besar Sampel Penelitian	31
3.6. Bahan dan Cara Kerja	32
3.6.1. Analisis Ekspresi Gen MnSOD dan HIF-1 α	32
3.6.1.1. Isolasi RNA	32
3.6.1.2. Desain Primer	34
3.6.1.3. Amplifikasi cDNA dengan Real Time PCR	34
3.6.2. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	35
3.7. Analisis Statistik	38
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1. Proses Analisis Kadar Relatif mRNA MnSOD dan HIF-1 α	39
4.1.1. Isolasi RNA	39
4.1.2. Desain Primer	39
4.1.3. Proses Amplifikasi cDNA dengan Real Time PCR	40
4.2. Analisis Kadar Relatif mRNA MnSOD	45
4.3. Analisis Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	46
4.3.1. Pembuatan Kurva Standar SOD	46
4.3.2. Penetapan Kadar Protein	46
4.3.3. Penetapan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	47
4.4. Hubungan Antara mRNA MnSOD dengan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD pada Sel Glioma	50
4.5. Analisis Kadar Relatif mRNA HIF-1 α	53
4.6. Ekspresi Gen MnSOD pada Hipoksia Sel Glioma	56
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
5.1. Kesimpulan	60
5.2. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	68
BIODATA PENULIS.....	99
ARTIKEL JURNAL	100

DAFTAR GAMBAR

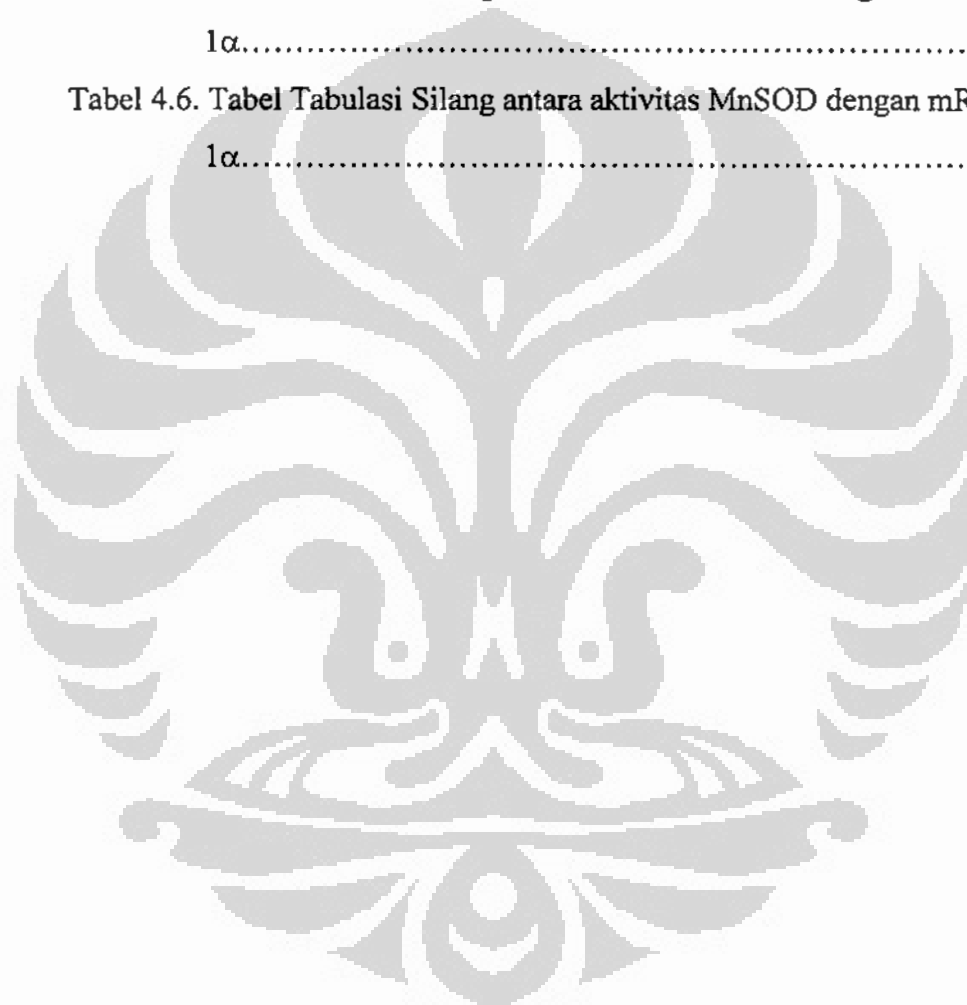
Gambar 2.1. Struktur MnSOD	12
Gambar 2.2. Produksi radikal superoksida pada rantai pernapasan	13
Gambar 2.3. Skema Proses Netralisir H ₂ O ₂	14
Gambar 2.4. Area nekrotik pada tumor	20
Gambar 2.5. Hipoksia Akut	20
Gambar 2.6. Struktur HIF-1 α	23
Gambar 2.7. Mekanisme degradasi HIF-1 α oleh pVHL	24
Gambar 2.8. Prolil dan Asparaginil Non Hidroksilasi.....	25
Gambar 2.9. Kurva Fluoresens pada Real Time PCR.....	28
Gambar 2.10. SYBR Green I.....	29
Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis RNA	39
Gambar 4.2. <i>Melting Curve</i> pada Real Time PCR	42
Gambar 4.3. Nilai Ct pada Kurva Fluoresensi Real Time PCR	43
Gambar 4.4. Diagram batang distribusi sampel kadar relatif mRNA MnSOD Pada Sel Glioma.....	45
Gambar 4.5. Kurva Semilog Standar SOD	47
Gambar 4.6. Kurva Standar Protein	47
Gambar 4.7. Diagram batang distribusi sampel kadar relatif aktivitas spesifik enzim MnSOD	48
Gambar 4.8. Diagram batang kadar relatif mRNA MnSOD dan aktivitas spesifik MnSOD	50
Gambar 4.9. Diagram scatter mRNA MnSOD dengan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	51
Gambar 4.10. Diagram batang distribusi sampel kadar relatif mRNA HIF-1 α ..	53
Gambar 4.11. Diagram batang variasi peningkatan HIF-1 α	55
Gambar 4.12. Diagram batang perbandingan antara kadar relatif mRNA MnSOD dengan kadar relatif mRNA HIF-1 α	56

Gambar 4.13. Diagram scatter antara kadar relatif mRNA MnSOD dengan
mRNA HIF-1 α 58



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Desain Primer dengan Program Primer3	40
Tabel 4.2. Hasil Optimalisasi Suhu Annealing	41
Tabel 4.3. Pengelompokan Derajat Tingkat Ekspresi Relatif	44
Tabel 4.4. Pengelompokan Kadar Relatif Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	47
Tabel 4.5. Tabel Tabulasi Silang antara mRNA MnSOD dengan mRNA HIF- 1 α	57
Tabel 4.6. Tabel Tabulasi Silang antara aktivitas MnSOD dengan mRNA HIF- 1 α	57



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Data <i>Gene Bank</i>	68
LAMPIRAN 2. Tabel Pengukuran SOD	73
LAMPIRAN 3. Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA	74
LAMPIRAN 4. Desain Primer	75
LAMPIRAN 5. Analisis Primer	78
LAMPIRAN 6. Nilai C(t) pada Real Time PCR	81
LAMPIRAN 7. Tabel Data Hasil Analisis Real Time PCR Metode Pfaffl	83
LAMPIRAN 8. Data Kasar pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD	86
LAMPIRAN 9. Tabel Data Hasil Analisis Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD ...	88
LAMPIRAN 10. Analisis Statistik	89
LAMPIRAN 11. <i>Ethical Clearance</i>	95
LAMPIRAN 12. Lembar <i>Informed Consent</i>	96
LAMPIRAN 13. Data Demografi Pasien	98

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Glioma adalah bentuk tumor otak primer yang paling sering (~50-70%) ditemukan di Indonesia. Tumor ini mempunyai karakter seperti sel glia, yang merupakan sel-sel khusus yang dalam keadaan normal berfungsi memelihara fungsi dan interaksi neuron-neuron. Penderita glioma mempunyai angka harapan hidup (*survival rate*) yang rendah. Glioma derajat tinggi sering hanya bertahan 6 bulan setelah operasi pengangkatan tumor. Walaupun terapi radiasi merupakan terapi yang paling efektif untuk glioma, namun kebanyakan tumor tersebut resisten terhadap terapi radiasi.^{1,2} Oleh karena itu, diperlukan terapi tambahan yang dapat meningkatkan sensitivitas sel tumor terhadap radiasi, misalnya dengan terapi gen supresor tumor.³

MnSOD (*Manganese-Superoxide Dismutase*) merupakan enzim antioksidan endogen, isozim dari enzim Superoksida dismutase (SOD) yang terletak pada matriks mitokondria semua sel. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Pada sel manusia, isozime SOD lainnya ialah Cu/ZnSOD yang secara dominan ditemukan di sitoplasma serta SOD ekstraseluler (EC-SOD). MnSOD merupakan antioksidan utama karena sebagian besar mitokondria mengkonsumsi lebih dari 95% oksigen sel, sehingga rantai transpor elektron mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) endogen.^{4,5} ROS adalah molekul yang mengandung oksigen dan mempunyai reaktivitas yang lebih tinggi dari molekul oksigen, contoh $O_2^{\cdot-}$. 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.⁵⁻⁷ Stres oksidatif dapat berimplikasi pada berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes dan penuaan.^{6,7}

MnSOD diduga berperan sebagai supresor tumor berdasarkan beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa MnSOD ditemukan rendah pada beberapa

sel kanker serta peningkatan ekspresi MnSOD dapat menekan pertumbuhan berbagai sel kanker, menekan transformasi keganasan yang diinduksi oleh radiasi serta menghambat metastasis sel kanker.⁸⁻¹⁰ Epperly et al (1998) membuktikan bahwa peningkatan ekspresi MnSOD menyebabkan mencit yang diinduksi kanker paru menjadi lebih sensitif terhadap radiasi. Selain itu juga ternyata terapi tersebut juga dapat bersifat radioprotektif, MnSOD melindungi jaringan normal di sekitar sel kanker pada saat terapi radiasi.¹¹ Namun demikian, peran MnSOD sebagai supresor tumor masih kontroversial. Beberapa penelitian bahkan membuktikan bahwa ekspresi MnSOD tinggi pada beberapa kanker manusia, termasuk pada glioma.¹² Selain itu juga ditunjukkan bahwa kadar MnSOD berkorelasi langsung dengan derajat tumor dan kadar MnSOD yang tinggi berkaitan dengan prognosis buruk. Sebagai antiapoptosis, MnSOD yang diekspresi berlebihan pada sel tumor diduga dapat mengakibatkan sel tumor tersebut bertahan hidup sehingga menyebabkan resistensi terapi.¹³

Berdasarkan klasifikasi WHO glioma dapat dibagi menjadi derajat rendah dan derajat tinggi (malignan). Akan tetapi klasifikasi tersebut bukan merupakan satu-satunya indikator prognostik keberhasilan terapi radiasi, karena terdapat variasi respon terapi radiasi yang luas pada kelompok dengan derajat keganasan yang sama. Penelitian Renindra (2008), menunjukkan hasil bahwa ukuran tumor setelah radiasi pada kelompok tumor dengan derajat keganasan rendah bervariasi antara 10 – 70 % dari ukuran sebelum radiasi. Demikian pula pada kelompok derajat keganasan tinggi, ukuran tumor setelah radiasi bervariasi antara 30 – 70 % dari ukuran tumor sebelum radiasi.¹⁴ Dengan demikian terdapat faktor lain yang menyebabkan variasi hasil terapi radiasi tersebut, misalnya kondisi hipoksia yang berbeda pada setiap jenis glioma yang mungkin mempengaruhi respon radiasi.

Tumor solid manusia, termasuk glioma mempunyai status oksigen yang kurang baik dibandingkan dengan jaringan normal. Konsentrasi oksigen pada jaringan normal sekitar 40 – 60 mmHg. Kebalikannya setengah dari tumor *solid* menunjukkan nilai kurang dari 10 mmHg bahkan lebih kecil dari 10 % rentang nilai normal.¹⁵ Kondisi hipoksia pada sel tumor tersebut akan menurunkan respon jaringan tumor terhadap terapi radiasi dikarenakan terapi radiasi memerlukan oksigenisasi yang baik.^{15,16} Dengan adanya oksigen maka sensitivitas radiasi

meningkat 2,5 – 3 kali. Mekanisme sensitisasi tersebut terjadi akibat terikatnya oksigen oleh radikal bebas dan akan membentuk peroksida yang lebih stabil sehingga memfiksasi kerusakan DNA sel tumor.¹⁷

Hipoksia dapat dideteksi dengan suatu penanda jaringan hipoksia yaitu HIF-1. HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Molekul HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari subunit α dan subunit β . Namun hanya subunit α yang stabilitas dan aktivitasnya ditingkatkan pada kondisi hipoksia. Sehingga subunit ini yang dipercaya sebagai penanda jaringan yang hipoksia.¹⁸ HIF-1 α sebagai petanda jaringan hipoksia dideteksi pada kebanyakan jenis kanker padat seperti pada kanker otak, kandung kemih, payudara, usus, ovarium, pankreas, ginjal, dan prostat. Secara klinis, overekspresi HIF-1 α bisa dijadikan sebagai marker pada penyakit-penyakit dalam kondisi agresif tinggi dan sulit dilakukan pengobatan. HIF-1 akan mengaktifkan gen yang memungkinkan sel tumor tetap hidup dan berkembang dalam kondisi lingkungan kanker yang hipoksik.¹⁵

Pada kondisi hipoksia akan terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species (ROS)*. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ROS ikut berpartisipasi dalam jalur transduksi sinyal hipoksia serta berperan dalam menstabilkan HIF-1 α .¹⁹ Aktivitas MnSOD pada kondisi hipoksia akan menurun.^{20,21} Namun aktivitas MnSOD tersebut dapat diaktifkan untuk mengkompensasi kerusakan sel akibat radikal bebas selama stres hipoksia.²¹ Dengan demikian penelitian mengenai ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia masih memberikan hasil yang berbeda.

Seperti yang telah disebutkan di atas bahwa terdapat pendapat yang kontroversi mengenai dugaan MnSOD sebagai supresor tumor, maka perlu diketahui bagaimana ekspresi gen MnSOD pada sel tumor, khususnya pada sel glioma manusia. Profil ekspresi gen MnSOD pada sel glioma manusia diharapkan dapat menjelaskan bagaimana peran MnSOD pada sel tersebut. Selain itu perlu juga dianalisis bagaimana ekspresi gen MnSOD pada keadaan hipoksia sel glioma, mengingat peran MnSOD sebagai antioksidan yang dapat mempengaruhi kadar ROS yang meningkat pada kondisi hipoksia. Kondisi hipoksia pada sel

glioma tersebut dapat memperkirakan respon sel glioma terhadap terapi radiasi, yang akan dianalisis melalui ekspresi gen HIF-1 α . Ekspresi gen MnSOD akan dianalisis berdasarkan jumlah mRNA MnSOD dan aktivitas enzim spesifik MnSOD pada sel glioma. Sedangkan ekspresi gen HIF-1 α akan dianalisis berdasarkan jumlah mRNA HIF-1 α . Analisis mRNA MnSOD dan HIF-1 α tersebut menggunakan Real Time PCR yang dapat menganalisis mRNA secara kuantitatif. Oleh karena sel otak normal tidak dapat digunakan sebagai pembanding, maka digunakan sel leukosit penderita glioma untuk mendapatkan gambaran umum ekspresi gen MnSOD dan HIF-1 α pada sel normal.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah dapat disimpulkan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana ekspresi gen MnSOD pada sel glioma penderita dibandingkan dengan sel leukosit penderita sebagai kontrol?
2. Bagaimana kondisi hipoksia pada sel glioma penderita dibandingkan dengan sel leukosit penderita sebagai kontrol melalui analisis ekspresi gen HIF-1 α ?
3. Bagaimana ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma ?

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum:

1. Menganalisis ekspresi gen MnSOD pada sel glioma dan sel leukosit penderita
2. Menganalisis hipoksia pada sel glioma dan sel leukosit penderita melalui analisis ekspresi gen HIF-1 α
3. Menganalisis ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma.

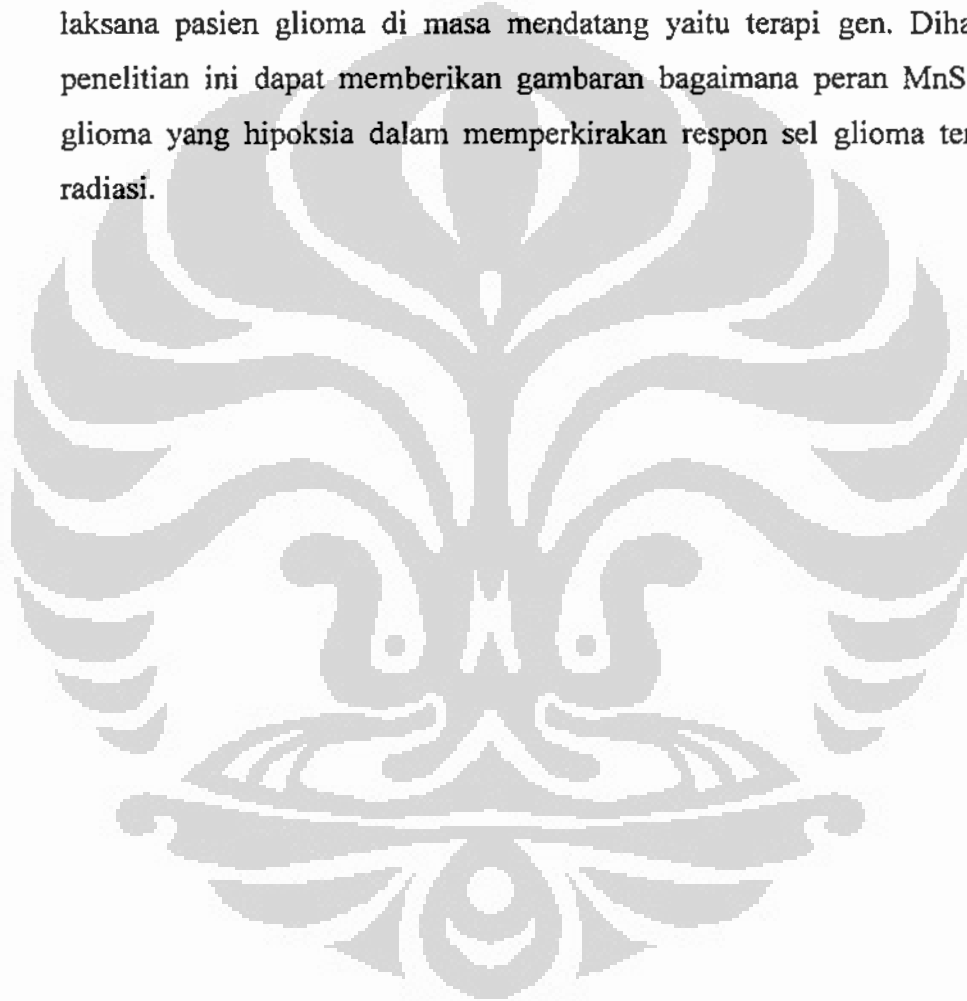
I.3.2 Tujuan Khusus:

1. Menentukan secara kuantitatif jumlah mRNA MnSOD pada sel glioma dan sel leukosit penderita
2. Menentukan aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sel glioma dan sel leukosit penderita

3. Menentukan secara kuantitatif jumlah mRNA HIF-1 α pada sel glioma dan sel leukosit penderita
4. Menganalisis ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma.

I.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui profil ekspresi gen MnSOD dan ekspresi gen HIF-1 α pada sel glioma manusia untuk perbaikan tata laksana pasien glioma di masa mendatang yaitu terapi gen. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran bagaimana peran MnSOD pada sel glioma yang hipoksia dalam memperkirakan respon sel glioma terhadap terapi radiasi.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Glioma

Glioma merupakan tumor sistem saraf pusat yang berkembang dari sel glia. Sel glia mempunyai peran dalam memberikan nutrisi terhadap sel saraf, mempertahankan homeostasis, membentuk mielin dan berpartisipasi dalam transduksi sinyal sistem saraf. Pada umumnya glioma terjadi pada otak, tetapi dapat pula mengenai sumsum tulang belakang maupun bagian lain dari sistem saraf pusat, seperti saraf optik/penglihatan. Setiap tumor otak merupakan suatu lesi desak ruang (*SOL/Space Occupying Lesion*) yang cukup berbahaya karena dapat menekan komponen otak, pembuluh darah serta cairan serebrospinalis.²²

2.1.1 Klasifikasi Glioma

Berdasarkan WHO, glioma diklasifikasikan menjadi 4 tingkat (*grade*) yaitu :²²

- *Grade 1* : astrositoma pilositik
- *Grade 2* : astrositoma difus
- *Grade 3* : astrositoma anaplastik (malignan)
- *Grade 4*: glioblastoma multiforme/GBM (umumnya ditemukan pada orang dewasa), prognosis *grade 4* ini paling buruk.

Klasifikasi berdasarkan WHO merupakan klasifikasi yang sering dipakai oleh klinisi. Klasifikasi glioma yang lain yaitu berdasarkan :

1. Tipe sel

Sel glia mempunyai beberapa tipe sel yaitu mikroglia dan makroglia. Mikroglia merupakan makrofag dalam sistem saraf pusat yang melindungi neuron. Sel ini ditemukan pada semua regio otak dan sumsum tulang belakang, jumlahnya sekitar 15 % dari total sel dalam sistem saraf pusat. Ukuran mikroglia relatif lebih kecil dibandingkan dengan makroglia, bersifat *mobile* dan jumlahnya akan meningkat apabila terjadi kerusakan pada otak. Makroglia dibedakan menjadi beberapa tipe sel yaitu astrosit, oligodendrosit, sel ependimal, dan glia radial. Astrosit merupakan tipe sel glia yang paling banyak. Sel ini mempunyai sejumlah tonjolan

yang menghubungkan neuron dengan pembuluh darah. Astrosit berperan dalam mengatur lingkungan kimia neuron dengan memindahkan kelebihan ion, terutama kalium serta berperan dalam mendaur ulang neurotransmitter yang dilepaskan selama transmisi sinaptik. Astrosit juga mengatur vasokonstriksi dan vasodilatasi melalui produksi substansi vasoaktif seperti asam arakidonat. Oligodendrosit merupakan sel yang melapisi akson dalam sistem saraf pusat, dengan membran selnya (*myelin*), menghasilkan suatu sarung mielin (*myelin sheath*). Sarung mielin tersebut merupakan isolator terhadap akson sehingga sinyal elektrik dapat menyebar lebih efisien. Sel ependimal merupakan sel yang melapisi kavitas sistem saraf pusat yang berperan dalam mengatur sirkulasi cairan serebrospinal.

Berdasarkan tipe-tipe sel glia tersebut, maka glioma dibedakan menjadi :

- ependimoma : berasal dari sel ependimal
- astrositoma : berasal dari astrosit
- oligodendroglioma : berasal dari oligodendrosit
- *mixed* glioma : oligoastrositoma, mengandung sel dari tipe sel glia yang berbeda

2. Derajat keganasan (*Grade*)

- Glioma derajat rendah (*Low Grade*) : berdiferensiasi baik, tumbuh lebih lambat, secara biologik kurang agresif, memiliki prognosis yang lebih baik bagi pasien
- Glioma derajat tinggi (*High Grade*) : Tidak berdiferensiasi/anaplastik, tumbuh cepat dan dapat menginvasi jaringan di sekitarnya, prognosis buruk bagi pasien.

Glioma derajat tinggi mempunyai vaskularisasi tumor yang sangat tinggi dan mempunyai kecenderungan untuk berinfiltrasi. Glioma tersebut mempunyai area hipoksik dan area nekrotik yang sangat luas. Pertumbuhan tumor sering merusak sawar darah otak (*blood-brain barrier*) di sekitar tumor. Oleh karena itu, glioma derajat tinggi sering tumbuh kembali/rekuren setelah terapi pembedahan eksisi komplit.

3. Lokasi

- Infratentorial : banyak ditemukan pada anak-anak (70 %)
- Supratentorial : banyak ditemukan pada orang dewasa (70 %)

2.1.2 Gejala Klinis Glioma

Gejala dan keluhan glioma tergantung dari bagian sistem saraf pusat yang terkena. Glioma pada otak dapat menyebabkan keluhan sakit kepala, mual dan muntah, kejang dan gangguan saraf kranial sebagai akibat dari peningkatan tekanan intrakranial. Glioma pada saraf optik/penglihatan dapat menyebabkan kehilangan penglihatan. Glioma pada sumsum tulang belakang dapat menyebabkan nyeri, kelemahan ataupun kematian rasa ekstremitas. Glioma tidak dapat bermetastasis/menyebar melalui aliran darah, tetapi dapat menyebar melalui cairan serebrospinal sehingga dapat menyebar ke sumsum tulang belakang.²³

2.1.3 Diagnosis Glioma

Sebagian besar pasien dengan glioma malignan mengeluh satu atau lebih gejala klinik neurologis yang durasinya bervariasi (biasanya minggu sampai bulan). Kadang-kadang, pasien tidak menderita gangguan neurologis apapun, dalam hal ini diagnosis glioma ditemukan secara tidak sengaja melalui pemeriksaan *CT (Computer Tomography) Scan*, misalnya pada saat pasien mengalami kecelakaan yang berhubungan dengan trauma di kepala.²³

Pemeriksaan *MRI (Magnetic Resonance Imaging)* otak mempunyai nilai lebih dalam menggambarkan lokasi tumor secara tepat dibandingkan dengan *CT Scan*. Pada saat ini telah tersedia pemeriksaan *Multi-voxel Magnetic Spectroscopy (MRS)* yang menilai metabolit kimia dalam jaringan tumor. Pemeriksaan *MRS* tersebut non invasif, lebih mudah dan lebih cepat serta dapat memperkirakan derajat keganasan glioma. Walaupun pemeriksaan *CT Scan/MRI/MRS* tersebut sangat membantu, namun pemeriksaan standar baku emas untuk menegakkan diagnosis glioma adalah pemeriksaan histopatologi jaringan tumor yang diperoleh melalui biopsi maupun kraniotomi.²³

2.1.4 Terapi Glioma

Terapi glioma di Indonesia hingga saat ini masih merupakan terapi konvensional yaitu pembedahan yang diikuti dengan radiasi dan/atau kemoterapi. Tindakan operasi bertujuan untuk mengurangi efek desak ruang yang ditimbulkan oleh glioma dan memperoleh sampel untuk diagnosis histopatologi. Prosedur operasi pada glioma yang dapat dipilih antara lain adalah reseksi tumor (*open craniotomy surgery*) dan biopsi stereotaktik. Prinsip *open craniotomy surgery* adalah melakukan reseksi massa tumor yang menyangat kontras untuk mengurangi ukuran tumor dengan menghindari mereseksi jaringan otak normal. Sedangkan biopsi stereotaktik adalah sebuah teknik operasi dengan menggunakan alat stereotaktik bertujuan mengambil jaringan tumor untuk diperiksa secara histopatologi. Teknik ini ideal untuk tumor glioma yang kecil, berlokasi lebih dalam atau glioma pada bagian otak yang fungsional, dimana tindakan kraniotomi mempunyai risiko lebih tinggi.^{24,25}

Hasil terapi pembedahan saja tanpa kombinasi dengan radioterapi belum menunjukkan angka yang memuaskan. Tujuan utama radioterapi yaitu untuk mengeradikasi tumor *in vivo* dengan memberikan sejumlah dosis radiasi yang diperlukan secara tepat pada daerah target radiasi, tanpa merusak jaringan sehat di sekitarnya. Tujuan akhir adalah meningkatkan ketahanan hidup penderita dengan menekan angka kambuh lokal dan metastasis jauh.²⁶

Kemoterapi merupakan pemberian obat antikanker yang bertujuan untuk meningkatkan *survival* pasien dibandingkan pembedahan dan radioterapi saja. Kemoterapi dapat diberikan bersamaan dengan terapi radiasi, baik secara simultan maupun setelah terapi radiasi. Saleman mengatakan bahwa kombinasi terapi pembedahan, radioterapi dan kemoterapi pada glioma derajat tinggi memberikan hasil angka harapan hidup rata-rata 10 bulan, dibandingkan 9,25 bulan untuk kombinasi pembedahan dan radioterapi.²⁵ Preparat kemoterapi yang digunakan antara lain 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), vinkristin, temozolamide (Temodal[®]), Capecitabine (Xeloda[®]).²⁷ BCNU dan vinkristin merupakan kemoterapi konvensional yang sering dipakai di Indonesia, sedangkan Temodal dan Xeloda masih jarang dipakai karena harganya yang relatif mahal.

2.2 Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)

Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) merupakan antioksidan endogen utama, isozim dari enzim *Superokside Dismutase* (SOD) yang terletak pada matriks mitokondria semua sel. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) seperti terlihat pada skema reaksi di bawah ini.^{4,5}



2.2.1 Ekspresi gen MnSOD

MnSOD dikode oleh kromatin inti sel (*nuclear chromatin*) pada sel eukariot. Gen MnSOD manusia terletak pada kromosom 6q25. Gen ini terdiri atas 5 ekson dan 4 intron. Promotor MnSOD manusia terdiri atas 78% GC tanpa TATA atau CAAT box dan mengandung banyak situs pengikatan untuk *specificity protein 1* (SP-1) dan *activating protein 2* (AP-2). Selain itu, terdapat banyak situs pengikatan untuk faktor transkripsi lainnya, terutama untuk anggota keluarga *zinc finger* seperti Sp3, AML-1a, MZF1. Promotor MnSOD mengandung tumpang tindih antara situs pengikatan SP-1 dan AP-2. SP-1 merupakan faktor transkripsi yang memainkan peranan positif dalam transkripsi gen sedangkan keluarga protein AP-2 menekan aktivitas promotor (antagonistik ekspresi gen).²⁸

Gen MnSOD sangat diinduksi oleh bermacam-macam senyawa dan kondisi yang menyebabkan stres oksidatif. Elemen penguat telah diidentifikasi dalam daerah sisi 5' seperti dalam daerah intron gen MnSOD manusia. Elemen ini mengandung sisi pengikatan beberapa faktor transkripsi yang meliputi *C/EBP-1*, *-2*, *-X*, *NF-κB*, dan *NF-1*. Mediator-mediator *pro inflamatori* (*LPS*, *TNFα*, *IL-1β*, *IFN-γ*) meregulasi ekspresi MnSOD.^{28, 29}

Hasil transkripsi MnSOD berupa mRNA MnSOD bermigrasi ke sitosol. Protein MnSOD dibuat dalam ribosom dalam bentuk prekursor dengan 223 asam amino. Prekursor MnSOD tersebut dipindahkan *post* tranlasi ke dalam matriks mitokondria. Proses transpor prekursor ini dilakukan dengan bantuan protein *Heat Shock 70* (HSP70) yang mulai berikatan dengan prekursor MnSOD sejak mulai disintesa di ribosom. Selanjutnya prekursor MnSOD yang telah berikatan dengan

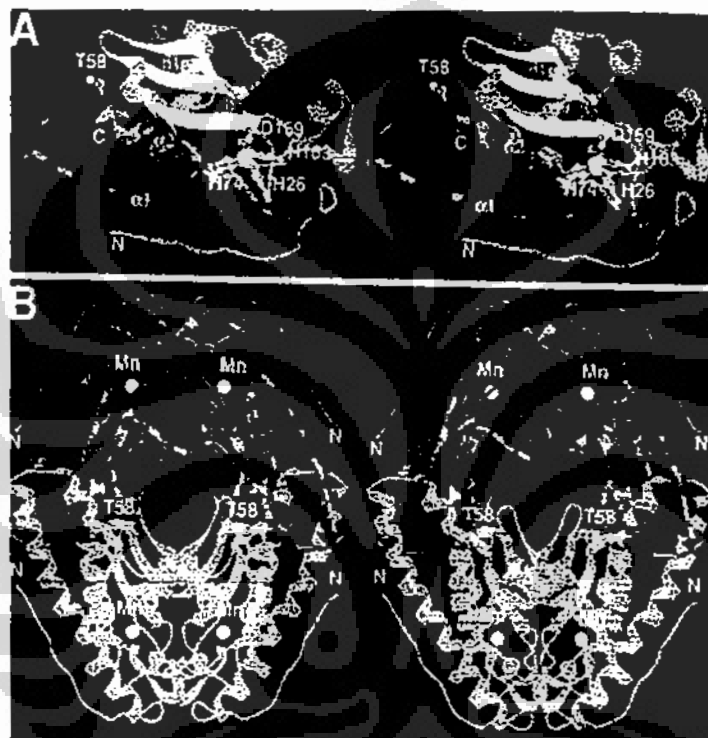
HSP 70 menempati reseptor pada permukaan membran luar mitokondria. Pengikatan dengan reseptor menyebabkan terbukanya sisi kontak, yaitu “pintu penghubung” antara matriks mitokondria dengan membran dalam dan luar mitokondria. Prekursor MnSOD masuk melalui sisi kontak dan berikatan dengan HSP70 dalam matriks. Selanjutnya dengan bantuan ATP ia masuk ke dalam HSP 60 di mana terjadi pelipatan protein prekursor MnSOD. Setelah itu, prekursor MnSOD yang telah terlipat keluar dari HSP 60. Prekursor MnSOD ini mengalami hidrolisis dan pemotongan sekuens *leader* peptida dengan bantuan protease sehingga terbentuklah protein MnSOD yang matang.²⁸

2.2.2 Struktur Protein MnSOD

Protein MnSOD pada eukariot adalah homotetramer dengan 4 subunit dan berat molekul sekitar 88 kDa. Protein MnSOD pada hati manusia pertama kali disekuon pada tahun 1984, dan ditemukan 196 asam amino pada masing-masing subunitnya. MnSOD merupakan protein yang cukup lestari (*conserved*), di mana terdapat lebih dari 40 % sekuen yang homologi antara manusia, ragi, *E. coli*, dan *B. stearotherophilus*.²⁸

Setiap subunit MnSOD manusia yang baru disintesis mempunyai 223 asam amino. Setelah dipindahkan ke mitokondria, masing-masing subunit MnSOD yang matang memiliki 198 asam amino. Setiap subunit mempunyai dimensi sekitar 40 X 47 X 49 Å dan dapat dibagi menjadi dua domain yang berbeda, yaitu: domain heliks jepit rambut N-terminal dan domain C-terminal α/β , yang terdiri dari tiga lembar antiparalel β dan lima heliks α (gambar 2.1. A). Sisi aktif mangan terletak antara heliks jepit rambut dan struktur lembaran β . Pada keadaan istirahat, sisi aktif ion logam berada dalam keadaan trivalen: Mn^{3+} . Empat residu asam amino, bersama-sama dengan molekul air atau gugus hidroksil, mengikat mangan. Empat residu asam amino yang ada pada dua domain adalah: His 26 dan His 74 dari domain N-terminal dan dari domain C-terminal: Asp 159 dan His 163. Interaksi tetramerik membentuk semacam terowongan besar yang terisi pelarut (*large solvent-filled tunnel*) yang langsung menuju sisi aktif.³⁰ Dua subunit MnSOD berpasangan menjadi dimer dengan sisi aktif atom mangan pada permukaan dimer. Residu D159, H163, H26, H74, dan molekul air dari

masing-masing subunit berperan dalam situs pengikatan logam. Pada manusia, 2 dimer MnSOD berpasangan menjadi suatu homotetramer dengan dimensi sekitar $60 \times 79 \times 79 \text{ \AA}$ (gambar 2.1. B).^{28,30} Dimer pada bagian atas dan dimer pada bagian bawah membentuk unit kristalografik yang asimetris. Lubang di bagian tengah yang terlihat, terbentuk dari rantai samping yang berdekatan pada permukaan persilangan lubang. Atom mangan pada sisi aktif terletak dekat permukaan dimer.



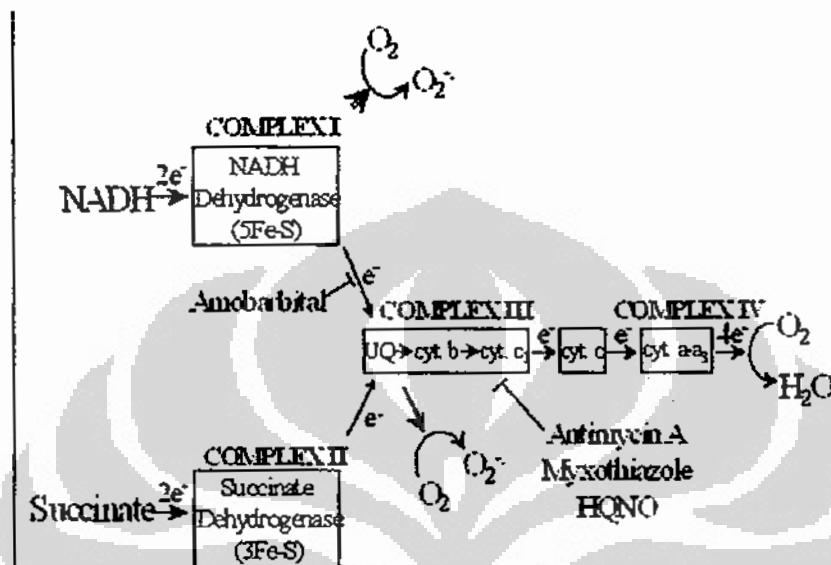
Gambar 2.1. Struktur MnSOD. Gambar A menunjukkan subunit MnSOD tunggal dengan domain N-terminal (bawah) dan domain C-terminal α/β (atas). Gambar B menunjukkan diagram tetramer MnSOD manusia.²⁸

Ada sejumlah residu yang diduga merupakan grup yang esensial terhadap fungsi katalitik. Empat di antaranya adalah H26, H81, D167, dan D171 (pada sekuens MnSOD *E.coli*), dua lainnya (H30 dan Y34) membentuk gerbang menuju sisi aktif dan yang lainnya (E170) terletak di bidang luar sisi pengikatan logam.³⁰

2.2.3 Peran MnSOD sebagai Antioksidan

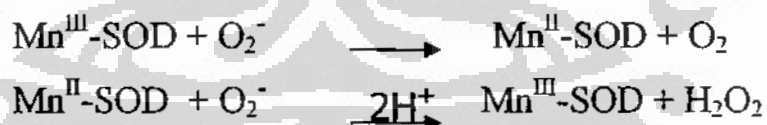
MnSOD sebagai antioksidan berperan dalam menetralkan radikal superoksida (O_2^{\bullet}) yang dihasilkan dari rantai transpor elektron mitokondria

(gambar 2.2). Radikal superoksida ini dapat memicu kerusakan enzim-enzim yang penting dalam metabolisme dan kerusakan biomolekul dalam tubuh. Bentuk superoksida yang terprotonasi, HO_2^\bullet lebih reaktif daripada $\text{O}_2^{\bullet-}$ karena dapat menginisiasi peroksidasi asam lemak.³¹



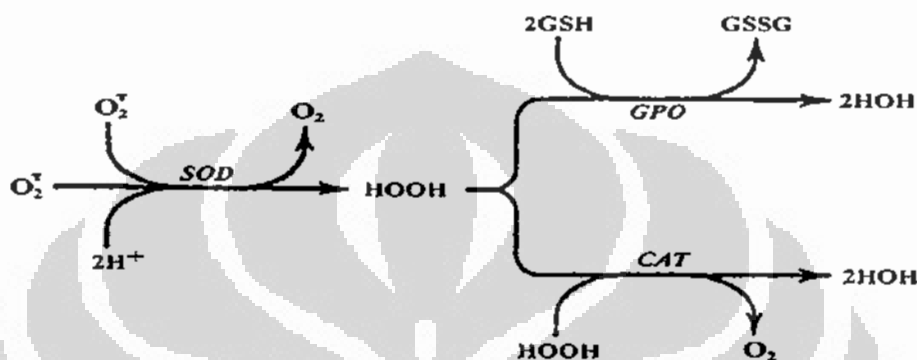
Gambar 2.2. Produksi radikal superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pada rantai pernapasan.³¹

Pada *E. coli*, $\text{O}_2^{\bullet-}$ dapat menyerang beberapa enzim yang terlibat dalam siklus Krebs seperti akonitase, fumarase dan dehidroksiasid dehidratase. Dengan demikian biosintesis asam amino dan metabolisme energi dalam siklus Krebs merupakan target utama yang dirusak oleh $\text{O}_2^{\bullet-}$. MnSOD menetralkan $\text{O}_2^{\bullet-}$ melalui dua langkah reaksi dismutasi sebagai berikut :



Reaksi enzimatis merupakan reaksi biomolekular dengan siklus katalitik yang melibatkan dua setengah reaksi yang berbeda, suatu reaksi oksidasi dengan substrat $\text{O}_2^{\bullet-}$ yang dioksidasi menjadi dioksigen serta suatu setengah reaksi reduksi, di mana $\text{O}_2^{\bullet-}$ diubah menjadi H_2O_2 . Konstanta laju untuk katalisis dismutasi MnSOD bergantung pada pH. Pada pH 7, k mirip dengan CuZnSOD, yaitu $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Pada pH 7.8, $k = 1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dan pada pH 10.2, k hanya $0.33 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Konstanta laju pada reaksi-reaksi ini bergantung pada potensial redoks dan konstanta laju penukaran elektron untuk kedua oksidator dan reduktor.

H_2O_2 merupakan kelompok ROS yang sangat tidak reaktif dan non radikal. Namun apabila, H_2O_2 bereaksi dengan besi (melalui reaksi Fenton) dan tembaga, maka dapat terbentuk radikal bebas hidroksil (OH^*) yang sangat reaktif. Oleh karena itu, terdapat mekanisme pertahanan antioksidan lain yaitu enzim katalase (CAT) dan Glutation (GSH) yang menetralkan H_2O_2 menjadi molekul H_2O dan molekul O_2 , seperti terlihat pada skema di bawah ini.³¹



Gambar 2.3. Skema Proses Netralisir H_2O_2 ³¹

2.2.4 Efek Biologi MnSOD

MnSOD merupakan enzim antioksidan endogen yang sangat penting bagi kehidupan. Mencit mutan homozigot yang tidak memiliki gen MnSOD meninggal dalam 1-18 hari setelah dilahirkan dan menunjukkan kardiomiopati, akumulasi lipid dalam hati & otot rangka serta asidosis metabolik. Penelitian Macmillan et al memperlihatkan bahwa mencit yang kekurangan MnSOD menunjukkan kerusakan degeneratif sistem saraf pusat, khususnya ganglia basalis dan batang otak yang berhubungan dengan kerusakan mitokondria.³²

MnSOD berperan pula dalam modulasi aktivitas beberapa faktor transkripsi yang sensitif redoks seperti NFkB and AP-1. Selain itu, MnSOD mengubah ekspresi gen yang berhubungan dengan apoptosis.³³ MnSOD berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan redoks dan *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler. Peningkatan MnSOD dapat melindungi jaringan normal dari stres oksidatif. Mencit transgenik yang mengekspresikan MnSOD berlebihan lebih tahan terhadap stres oksidatif dibandingkan dengan mencit kontrol.³⁴ Walaupun peningkatan ekspresi MnSOD pada kenyataannya dapat

menimbulkan akumulasi H_2O_2 yang juga merupakan kelompok ROS, namun H_2O_2 tersebut bermanfaat dalam terapi tumor.³⁵

MnSOD diduga sebagai supresor tumor berdasarkan beberapa penelitian yang menyebutkan bahwa ekspresi MnSOD menurun pada berbagai sel kanker serta peningkatan ekspresi MnSOD tersebut dapat menekan pertumbuhan berbagai sel kanker.³⁶ Mencit transgenik yang mengekspresikan MnSOD berlebihan lebih resisten terhadap karsinogen kimia.³⁴

2.2.5 Peran MnSOD sebagai Supresor Tumor

Kemungkinan peran MnSOD sebagai supresor tumor berdasarkan beberapa penelitian dengan sel yang ditransfeksi dengan gen MnSOD untuk meningkatkan aktivitas MnSOD. Peningkatan ekspresi MnSOD melalui transfeksi gen MnSOD tersebut dapat menekan pertumbuhan tumor baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.³⁶

Penelitian Li et al membuktikan bahwa terjadi penekanan pertumbuhan tumor yang diobservasi pada karsinoma payudara manusia MCF-7. Efisiensi dan fraksi klonogenik sel tumor dalam kultur agar menurun setelah transfeksi cDNA MnSOD. Ketika diinokulasikan terhadap mencit, pertumbuhan tumor secara nyata terhambat pada sel yang mengekspresikan MnSOD berlebihan dibandingkan dengan "wild type" atau kontrol sel normal. Hasil penelitian tersebut mendukung dugaan bahwa peningkatan ekspresi MnSOD dapat menekan pertumbuhan fenotif malignan sel kanker payudara manusia dan diduga gen MnSOD merupakan gen supresor tumor pada kanker payudara manusia.³⁷

Penelitian Yan et al membuktikan bahwa ketika cDNA MnSOD ditransfeksikan ke dalam sel fibroblast manusia SV-40, klon yang mengekspresikan MnSOD berlebihan memperlihatkan kecepatan pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan dengan sel kontrol neo (*vector*) dan parental.³⁸ Clair et al melakukan transfeksi cDNA MnSOD pada sel C3H 10T1/2 mencit. Peningkatan ekspresi MnSOD tersebut dapat melindungi sel dari transformasi keganasan yang diinduksi radiasi.³⁹

Venkataraman et al melakukan penelitian mengenai peran enzim antioksidan MnSOD pada kecepatan pertumbuhan sel kanker prostat manusia

(PC-3) yang tidak tergantung androgen secara *in vitro* dan *in vivo*. Kadar MnSOD ditemukan lebih rendah pada sel PC-3 parental dibandingkan dengan *nonmalignant* yaitu sel epitel prostat manusia (P69SV40T). Kemudian, PC-3 ditransfeksi dengan plasmid cDNA MnSOD sehingga ekspresi protein dan aktivitas MnSOD meningkat 7 sampai 8 kali lipat. Klon yang mengekspresikan MnSOD berlebihan tersebut memperlihatkan waktu pembelahan sel yang memanjang, hambatan pertumbuhan sel tumor serta penurunan kecepatan pertumbuhan *xenograft* tumor PC-3 pada mencit.⁴⁰ Selain itu, peningkatan ekspresi MnSOD dapat menghambat penyebaran/metastasis sel fibrosarkoma mencit, menghambat kecepatan pertumbuhan sel melanoma manusia, *fibroblast* manusia, sel karsinoma skuamosa mukosa pipi.⁴¹ Hambatan pertumbuhan tumor tersebut berkontribusi terhadap penurunan pembelahan sel/ menghambat proliferasi sel dibandingkan dengan peningkatan kematian sel. Melendez et al melakukan penelitian terhadap sel fibrosarkoma HT-1080 yang mengekspresikan MnSOD berlebihan. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa aktivitas MnSOD berkorelasi terbalik dengan proliferasi sel.⁴²

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memahami bagaimana mekanisme aksi peningkatan ekspresi MnSOD sebagai antiproliferatif sel tumor. Oberley et al memperlihatkan secara tidak langsung bahwa level H₂O₂ meningkat sebagai hasil dari peningkatan ekspresi MnSOD.³⁶ Rodriguez et al membuktikan secara tidak langsung, melalui transfeksi katalase (CAT) bahwa efek antiproliferatif MnSOD disebabkan oleh peningkatan produksi H₂O₂ sebagai hasil dari peningkatan ekspresi MnSOD.⁴³ Li et al menunjukkan bahwa terdapat hambatan supresi pertumbuhan tumor dari peningkatan ekspresi MnSOD melalui transfeksi Glutation Peroksidase (GPx).⁴⁴

H₂O₂ dapat memodulasi aktivitas AP-1, NF-κB, v-myb dan p53, yang semuanya itu berperan dalam mengatur proliferasi sel.²⁸ Beberapa penelitian menggunakan *fibroblast diploid* manusia menunjukkan bahwa H₂O₂ menginduksi penghentian pertumbuhan pada G1.⁴⁵ Begitu juga Barnouin et al menunjukkan bahwa siklus sel *multiphase* terhenti pada *fibroblast* mencit yang diinduksi H₂O₂. Peningkatan ekspresi MnSOD meningkatkan fraksi sel dalam fase G0/G1, dan menurunkan fraksi sel dalam fase S serta fase G2+M.⁴⁶ Peningkatan fraksi G0/G1

sebagai hasil peningkatan ekspresi MnSOD menyebabkan hambatan pertumbuhan disebabkan oleh progresi yang lebih lambat dari fase G1 menuju fase S (Sintesis). Peningkatan ekspresi MnSOD akan menyebabkan akumulasi H₂O₂. Konsentrasi H₂O₂ intraseluler akan mengubah lingkungan redoks sel dan mempengaruhi progresi selama siklus sel, dengan demikian mengubah kecepatan pertumbuhan. Level H₂O₂ yang lebih tinggi menyebabkan lingkungan seluler menjadi lebih teroksidasi sehingga pertumbuhan menjadi lebih lambat.⁴⁷ Peran H₂O₂ dalam menekan pertumbuhan tumor juga didukung dari mekanisme kerja obat antikanker.

Beberapa obat antikanker membunuh sel target setidaknya sebagian melalui peningkatan sejumlah H₂O₂ intraseluler. H₂O₂ dapat menstimulasi molekul sinyal proapoptotik, seperti sinyal apoptosis BAX, *mitogen-activated protein kinase*, ekspresi ligan fas atau melalui kaskade *apoptotic mitokondrial*.³⁵ Beberapa dugaan mekanisme efek supresor tumor lainnya yaitu peningkatan ekspresi MnSOD dapat memodulasi onkogen spesifik, *upregulasi* inhibitor protease dan hambatan faktor transkripsi AP-1 dan NF-κB.⁴⁸

2.2.6 Terapi Gen MnSOD

Terapi gen adalah insersi gen ke dalam sel suatu individu dan jaringan untuk mengobati penyakit, terutama untuk penyakit keturunan. Tujuan utama terapi gen adalah untuk menambahkan alel yang fungsional pada alel mutan yang rusak. Agar gen yang akan dimasukkan dapat ditransmisikan secara normal pada keturunan, maka gen tersebut bukan saja perlu diinsersikan ke dalam sel, namun juga harus diinkorporasikan ke dalam kromosom dengan rekayasa genetika.³

Pada kanker paru, terapi gen MnSOD pada awalnya dilakukan pada tikus dengan tumor ortotopik paru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberikan kompleks plasmid/liposom yang mengandung gen MnSOD lebih sensitif terhadap radiasi daripada hewan lainnya. Ketahanan hidup setelah radiasi pada tikus yang diberi MnSOD lebih tinggi dibandingkan dengan tikus tidak mendapat terapi gen MnSOD, tampaknya MnSOD dapat melindungi jaringan paru yang normal dari efek radiasi yang merusak. Efek perlindungan tersebut tidak terjadi pada sel tumor paru.¹¹ Keberhasilan terapi gen MnSOD pada kanker

paru tikus melatarbelakangi penelitian pemberian kompleks plasmid/liposom MnSOD pada penderita kanker paru "*non-small cell*" mulai tahun 2005 dan direncanakan selesai pada tahun 2011 di Universitas Pittsburgh dalam tahap uji klinik fase II. Tujuan uji klinik tersebut untuk melihat keamanan, efikasi dan kelayakan (*feasibility*) dari kompleks plasmid/liposom MnSOD sebagai proteksi melawan radiasi yang dapat menginduksi esofagitis pada pasien kanker paru. Sediaan yang diberikan pada pasien berupa 15 ml cairan yang mengandung baik 0,3 mg; 3.0 mg maupun 30.0 mg kompleks plasmid/liposom MnSOD.⁴⁹

Pada tumor pelvik yang menerima radioterapi sering terjadi sistisis saluran kemih. Radiasi menginduksi pembentukan radikal superoksida yang merusak urotelium, menyebabkan pendarahan dari otot halus ke urin, iritasi saraf yang hebat dan disfungsi otot. Terapi gen MnSOD dapat melindungi kandung kemih tikus yang diinduksi radiasi. Luka urotelium dalam waktu 48 jam setelah radiasi pada kandung kemih tikus yang ditransfeksi dengan gen MnSOD manusia sebelum radiasi lebih sedikit dibandingkan dengan kandung kemih tikus yang tidak ditransfeksi dengan gen MnSOD. Dengan demikian transfeksi gen MnSOD pada urotelium memperlambat laju kerusakan karena radiasi.⁵⁰

Penelitian terapi gen MnSOD dilakukan juga pada tikus diabetes tipe 1 yang mengalami luka diabetik. Pada kasus diabetes mellitus, terjadinya hiperglikemia memperbesar tingkat oksigen melalui jalur NADPH oksidase dan protein kinase C, dan mengakibatkan tertundanya penyembuhan luka. Pada tikus yang mengalami diabetes tipe 1. Gen terapi MnSOD meningkatkan aktivitas MnSOD *cutaneous* yang memperbaiki penyembuhan luka diabetik yang tertunda.⁵¹

Pada glioma, penelitian terapi gen MnSOD baru dilakukan pada tikus. Zhong et al mempelajari efek overekspresi MnSOD melalui transfeksi cDNA MnSOD manusia pada sel glioma tikus (A172R). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel yang mengekspresikan MnSOD lebih dari 5 kali lipat menjadi lebih sensitif terhadap radiasi, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), dan butionin sulfoksamin serta mempunyai kecepatan pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan dengan sel normal.⁵²

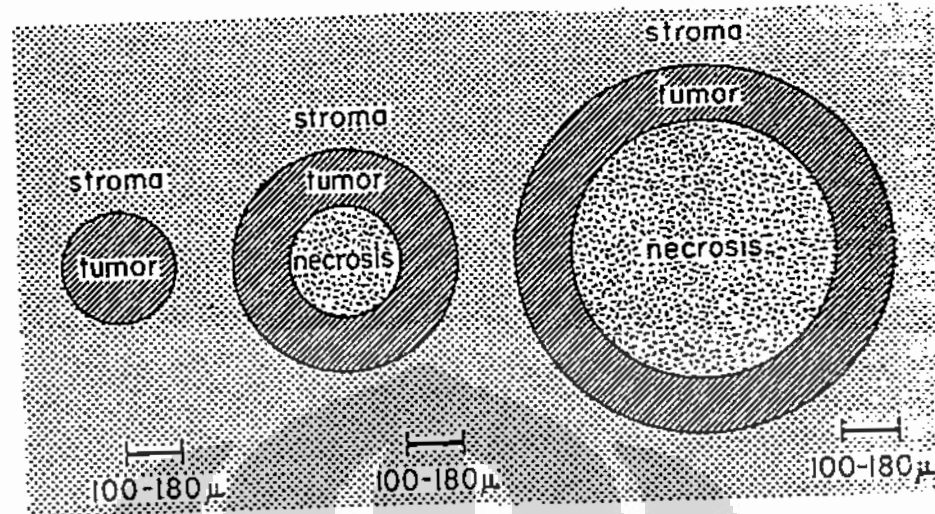
2.3 Hipoksia Pada Kanker

Tumor *solid* manusia mempunyai status oksigen yang kurang baik dibandingkan dengan jaringan normal. Dengan menggunakan elektroda jarum oksigen polarografik, pO_2 intra tumor telah ditentukan pada sejumlah tipe tumor yang berbeda yaitu pada kanker serviks, kanker payudara, kanker kepala dan leher dan pada sarkoma. Tekanan oksigen pada jaringan normal sekitar 40 – 60 mmHg. Kebalikannya setengah dari tumor *solid* menunjukkan nilai kurang dari 10 mmHg bahkan lebih kecil dari 10 % rentang nilai normal.¹⁵

2.3.1 Mekanisme Hipoksia Pada Kanker

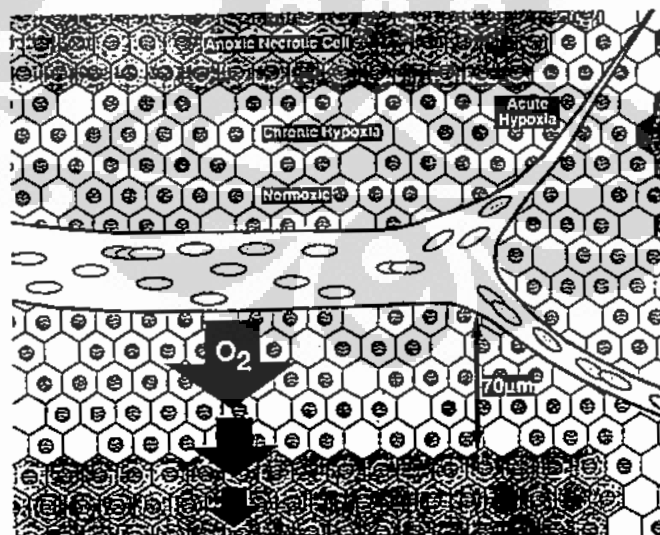
Hipoksia pada tumor terjadi karena terdapatnya area yang nekrotik, yang disebut dengan istilah hipoksia kronik/ *diffusion-limited hypoxia* serta terdapatnya oklusi intermiten pada pembuluh darah tumor, yang dikenal dengan hipoksia akut/ *perfusion-limited hypoxia*. Walaupun mekanisme yang melatarbelakangi pembentukan hipoksia akut belum diketahui, diduga berkembang dari tertutupnya/ 'blocking' pembuluh darah oleh sel tumor dan sirkulasi darah, kolapsnya pembuluh darah akibat tekanan intersisial tumor yang tinggi, dan/atau interupsi dari aliran darah tumor. Semua faktor tersebut terjadi karena sifat alami pembuluh darah tumor yang rapuh, tidak teratur serta kaotik apabila dibandingkan dengan pembuluh darah jaringan normal.⁵³

Hipoksia kronik merupakan hasil dari terbatasnya jarak difusi oksigen dalam jaringan yang aktif melakukan metabolisme oksidatif. Sel menjadi hipoksia pada periode yang lama sampai sel tersebut mati dan menjadi nekrotik. Ketika tumor tumbuh lebih besar, maka pusat nekrotik juga membesar, sehingga ketebalan sisa lembaran sel tumor yang *viable* adalah tetap. (gambar 2.4). Sel tumor dapat berproliferasi dan tumbuh secara aktif hanya apabila asupan oksigen atau nutrisi tertutup dari stroma. Jarak dimana oksigen masih dapat berdifusi dalam jaringan yaitu sekitar 150 μm . Jarak tersebut hanya cukup untuk sel tumor yang *viable*. Dengan demikian deplesi oksigen merupakan faktor utama untuk perkembangan area nekrotik dalam tumor.⁵³



Gambar 2.4. Area nekrotik pada tumor. Tidak ada nekrosis yang terlihat pada tumor ukuran kecil dengan suatu radius kurang dari 160 μm . Ketika area nekrotik meningkat, ketebalan lembaran sel tumor yang *viable* masih tetap sekitar 100 - 180 μm .⁵³

Daerah hipoksia akut berkembang dalam tumor sebagai hasil dari tertutupnya atau terhambatnya sebagian pembuluh darah secara temporer (gambar 2.5).



Gambar 2.5. Hipoksia akut merupakan hasil dari tertutupnya pembuluh darah tumor secara temporer.⁵³

Sel secara intermiten menjadi hipoksia karena normoksia terjadi beberapa kali ketika pembuluh darah terbuka. Apabila hambatan tersebut terjadi secara permanen, sel yang berada dibawah aliran darah yang terhambat tersebut akan mati. Namun, apabila pembuluh darah tumor tertutup dan terbuka secara acak, maka terdapat daerah berbeda dari tumor yang menjadi hipoksia secara selang seling. Faktanya, hipoksia akut adalah hasil dari *transient fluctuation* dalam aliran darah akibat malformasi pembuluh darah.⁵³

2.3.2 Implikasi Klinis

Efek biologi radiasi tergantung dari tingkat oksigenasi, dan sel hipoksik diperkirakan tiga kali lebih resisten daripada sel yang teroksigenasi dengan baik. Sel yang anoksik ($pO_2 < 0,5$ mmHg) memerlukan tiga kali dosis radiasi dibandingkan sel dengan $pO_2 > 20$ mmHg. Efek oksigen tersebut diperlukan karena adanya interaksi antara oksigen dan radikal bebas yang diproduksi ketika radiasi diserap dalam jaringan. Radiasi diserap dalam jaringan akan menghasilkan radikal bebas dengan waktu paruh pendek dan sangat reaktif. Radikal bebas tersebut akan memecah untai ganda DNA sehingga terjadi kematian sel. Oksigen meningkatkan kerusakan yang dihasilkan oleh radiasi melalui peningkatan waktu paruh radikal bebas. Oleh karena waktu paruh radikal bebas yang pendek, oksigen diperlukan sepanjang waktu radiasi untuk menghasilkan radiasi yang efektif.⁵³

Hockel et al mempelajari status oksigenasi pasien kanker serviks stadium IB-IIIB yang diberikan terapi operasi ($n=47$) atau terapi radiasi ($n= 42$). Ketahanan 3 tahun bebas penyakit bagi pasien yang diradiasi dengan pO_2 tumor > 10 mmHg sebesar 75 % dan 40 % pada pasien dengan pO_2 tumor < 10 mmHg. Sedangkan pada pasien yang akan dioperasi, ketahanan bebas penyakit adalah 70 % pada tumor yang teroksigenasi dengan baik dan hanya 40 % pada tumor yang hipoksia.⁵⁴ Fyles et al menemukan pada 74 pasien kanker servik stadium IB - IIIB yang diberikan radioterapi primer mempunyai angka ketahanan 2 tahun bebas penyakit sebesar 35 % untuk $pO_2 < 10$ mmHg serta 71 % untuk $pO_2 > 10$ mmHg.⁵⁵

Knocke et al menunjukkan penurunan ketahanan 3 tahun bebas penyakit sebesar 34 % pada pasien dengan $pO_2 < 10$ mmHg dan 69 % pada pasien dengan

$pO_2 > 10$ mmHg yang diobservasi pada 51 pasien kanker serviks stadium IB-IVB dengan terapi radiasi.⁵⁶

Tumor yang hipoksia biasanya mempunyai diameter yang lebih besar, infiltrasi parametrial lebih sering terjadi serta terdapat keterlibatan ruang vaskular-limf yang lebih ekstensif dibandingkan dengan tumor yang teroksigenasi dengan baik.⁵⁵ Fyles et al menemukan terjadi peningkatan hipoksia yang signifikan pada tumor yang sangat besar dengan diameter lebih dari 5 cm.⁵⁶

2.4 HIF-1 α sebagai Petanda Hipoksia

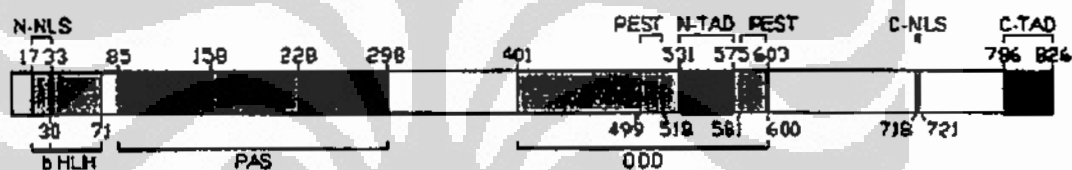
HIF-1 adalah faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen baik pada tingkat seluler maupun pada tingkat sistemik. Molekul HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari subunit α dan subunit β . Namun hanya subunit α yang stabilitas dan aktivitasnya ditingkatkan pada kondisi hipoksia. Sehingga subunit ini yang dipercaya sebagai penanda jaringan yang hipoksia.

2.4.1 Struktur HIF-1

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) adalah heterodimer yang tersusun atas subunit α dan β yang masing-masing mengandung dua domain karakteristik yaitu domain berupa *basic helix-loop-helix* (bHLH) dan domain PAS (Per-AHR-ARNT-Sim). Domain PAS merupakan kompleks dari famili: *Drosophila period* (Per); *protein single-minded* (Sim); *mamalian aryl hydrocarbon receptor* (AHR) dan *protein aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT). PAS juga mengandung dua unit internal homologi yaitu A dan B yang terlibat dalam interaksi antar protein. Protein PAS ditemukan pada banyak spesies termasuk pada prokariot yang menunjukkan tingginya kestabilan evolusi.⁵⁷

Domain bHLH yang umum pada sejumlah besar faktor transkripsi diperlukan baik untuk proses dimerisasi protein maupun pengikatan DNA. Pada HIF-1, efisiensi tertinggi dari heterodimerisasi dicapai jika domain bHLH dan PAS dalam kondisi utuh. HIF-1 α mengandung 826 asam amino dengan berat molekul sekitar 120 kDa. Pada bagian N-terminal mengandung domain *basic* (aa 17-30), domain *helix-loop-helix* (aa 31-71), dan domain PAS (aa 85-298) dengan

PAS-A (aa 85-158) dan PAS-B (aa 228-298). Dua domain transaktivasi yaitu N-terminal dan C-terminal TAD berada pada lokasi asam amino 531-575 dan 786-826. Selain itu, C-terminal juga mengandung domain yang berperan dalam mendegradasi HIF-1 α pada kondisi normoksik (kondisi O₂ normal) yaitu *oxygen-dependent degradation domain* (ODD pada aa 401-603). Domain ini mengandung dua *PEST-like motifs* yaitu sekuens yang kaya akan prolin (P), asam glutamat (E), serin (S), dan treonin (T) pada posisi asam amino 499-518 dan 581-600, merupakan bagian yang umum ditemukan pada protein dengan waktu paruh yang pendek (kurang dari 2 jam). Waktu paruh HIF-1 α pada kondisi normoksik adalah kurang dari 10 menit sehingga proteinnnya sangat sulit dideteksi. HIF-1 α juga mengandung dua *nuclear localization signals* yaitu N-NLS (aa 17-74) dan C-NLS (aa 718-721).⁵⁷ Skema struktur HIF-1 α terdapat pada gambar 2.6.

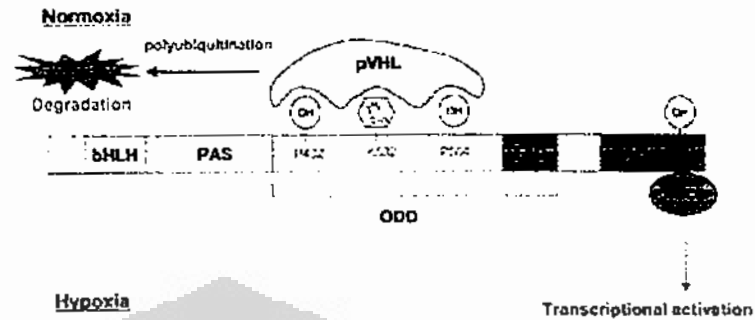


Gambar 2.6. Struktur HIF-1 α . Nomor menunjukkan urutan asam amino pada masing-masing domain. Domain-domain tersebut adalah *basic helix-loop-helix* (bHLH), Per-AHR-ARNT-Sim (PAS-A dan PAS-B), *oxygen-dependent degradation domain* (ODD), dan *transactivation domain* (N-TAD dan C-TAD). Juga ditunjukkan *PEST-like motif* dan *nuclear localization signals* (NLS).⁵⁷

2.4.2 Degradasi HIF-1 α

Pada kondisi normoksia, HIF-1 α mengalami ubiquinasi dan didegradasi oleh proteasom 26S secara proteolisis. Proses ubiquinasi diperankan oleh von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL). Domain β berinteraksi langsung dengan domain ODD pada HIF-1 α . pVHL berperan sebagai komponen pengenalan substrat dari kompleks protein ligase E3 ubiquitin. Pengikatan pVHL dengan domain ODD dan kemudian mengalami proses ubiquinasi pada N dan C terminal harus didahului proses hidroksilasi residu prolin (Pro 402 pada N-terminal dan Pro 564 pada C-terminal). Proses ini dikatalisis oleh *HIF-1 prolin 4-*

hidroksilase (PHD) yang memerlukan kofaktor Fe^{2+} .^{18,57} Gambar 2.7 menunjukkan mekanisme degradasi HIF-1 α oleh pVHL.⁵⁷

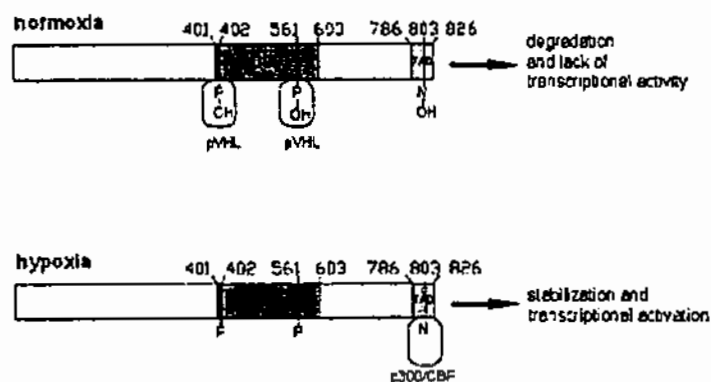


Gambar 2.7. Mekanisme degradasi HIF-1 α oleh pVHL.⁵⁸

Protein pVHL bukan satu-satunya jalur yang mengatur kandungan HIF-1 α , protein ligase MDM2 ubiquitin juga berinteraksi dengan HIF-1 α melalui tumor supresi p53 yang selanjutnya mengalami ubiquinasi dan degradasi proteosomal. Jalur degradasi HIF-1 α yang lainnya adalah melalui *heat shock protein 90* (Hsp-90) yang berinteraksi langsung dengan HIF-1 α dan diduga menyebabkan perubahan konformasi HIF-1 α sehingga menghalangi dimerisasi dengan HIF-1 β .

2.4.3 Aktivasi HIF-1 α

Aktivasi transkripsi HIF-1 terjadi melalui ikatan dengan target DNA sekuens dan dengan bantuan kofaktor transkripsi. Domain transaktivasi HIF-1 α (TAD) akan membentuk kompleks dengan koaktivator transkripsi untuk berikatan dengan promoter gen target HIF-1. Koaktivator p300/CBP berinteraksi melalui domain CHI (*cysteine-histidine rich*) dengan HIF-1 α TAD dan merekrut aksesoris koaktivator seperti *acetyltransferase* SRC-1, TIF-2, dan *redox factor* Ref-1. Pada kondisi normoksia residu asparagin di dalam domain C-TAD mengalami hidroksilasi yang juga di katalis oleh enzim dioksigenasi. Karena itu, p300/CBP hanya akan berinteraksi dengan C-TAD jika asparagin dalam kondisi nonhidroksilasi yang memungkinkan terbentuknya kompleks transkripsi. Gambaran asparagin dan prolin nonhidroksilasi yang menstabilkan dan mengaktifkan HIF-1 α terdapat pada gambar 2.8.^{18,57}



Gambar 2.8. Gambaran profil dan asparaginil yang tidak terhidroksilasi pada hipoksia akan menstabilkan dan mengaktifkan HIF-1 α .⁵⁷

Dimerisasi antara HIF-1 α dengan HIF-1 β terjadi di inti dan berperan sangat penting untuk terjadinya pengikatan DNA dan aktivasi transkripsi. Berbeda dengan HIF-1 β yang berlokasi di inti, translokasi HIF-1 α ke inti berhubungan dengan teraktifkannya HIF-1 dalam kondisi hipoksia.

Setelah terjadi stabilisasi subunit α , translokasi ke inti, dan dimerisasi, HIF-1 akan terikat pada *consensus HIF-1 binding site* (HBS) yaitu sekuens (A/G)CGTG di dalam *hypoxia respon element* (HRE) yang kemungkinan berlokasi di daerah promoter atau *enhancer* dari gen target. Kebanyakan, gen yang diinduksi hipoksia pada daerah HRE juga memiliki *HIF-1 ancillary sequences* (HAS) yang berlokasi sekitar 8-9 nukleotida dari HBS dan juga berfungsi dalam aktivasi transkripsi.⁵⁷

Daftar gen yang diaktivasi oleh HIF-1 terus bertambah termasuk gen yang produk proteinnya berfungsi dalam memelihara kondisi O₂ homeostesis dan untuk beradaptasi dengan perubahan konsentrasi oksigen. Kelompok pertama adalah gen yang terlibat dalam perkembangan dan fungsi 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*).⁵⁷

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. 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.⁵⁷

Nilai HIF-1 α sebagai petanda hipoksia bergantung pada konsentrasi oksigen dalam suatu sel/jaringan. Penelitian secara *in vitro* pada sel S3 HeLa mengindikasikan bahwa HIF-1 α stabil pada konsentrasi oksigen di bawah 6 %.⁵⁸ Vordermark et al melaporkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi HIF-1 α pada sel glioblastoma manusia U87 MG jika perlakuan hipoksia semakin ditingkatkan.⁵⁹

2.4.4. Ekspresi HIF-1 α pada Kanker

HIF-1 α dideteksi pada kebanyakan jenis kanker padat seperti pada kanker otak, kandung kemih, payudara, usus, ovarium, pankreas, ginjal, dan prostat. Secara klinis, overekspresi HIF-1 α bisa dijadikan sebagai marker pada penyakit-penyakit dalam kondisi agresif tinggi dan sulit dilakukan prognosis maupun sering gagalnya pengobatan terhadap sejumlah kanker termasuk kanker payudara, ovarium, serviks, oligodendroglioma, *esophageal*, dan kanker *oropharyngeal*.

Pada kanker payudara, overekspresi HIF-1 α menunjukkan makin meningkatnya kegagalan pengobatan dan berakibat kematian walaupun secara histopatologi menunjukkan kankernya masih diklasifikasikan rendah. Pada penderita kanker *oropharyngeal*, menunjukkan bahwa overekspresi HIF-1 α lebih dari 10% sel tumor mengalami kegagalan pengobatan dan radioterapi tiga kali lebih besar dibanding pasien dengan overekspresi HIF-1 α kurang dari 10%.^{57,60}

Birner et al memeriksa ekspresi HIF-1 α dengan immunohistokimia pada 91 pasien kanker servik stadium IB. Studi tersebut menunjukkan bahwa HIF-1 α merupakan marker prognosis yang kuat untuk ketahanan bebas penyakit (*disease-free survival*). Ketahanan 5 tahun sebesar 80 % untuk pasien dengan ekspresi HIF yang *moderate* sampai negatif, sedangkan pada pasien dengan ekspresi HIF-1 α yang tinggi hanya menunjukkan angka sebesar 34 %.⁶¹

Bachtiary et al melaporkan bahwa overekspresi HIF-1 α merupakan faktor prediksi dan prognostik pada pasien kanker serviks yang menerima terapi radiasi

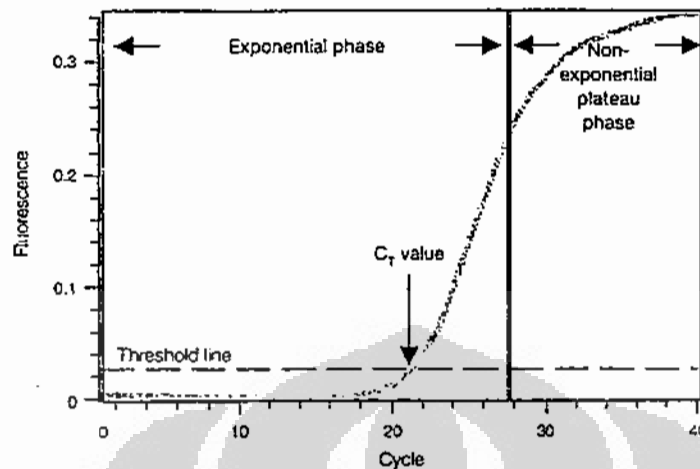
kuratif. Dengan pemeriksaan imunohistokimia pada 67 spesimen kanker serviks ditemukan 72,1 % ekspresi HIF-1 α . Overekspresi HIF-1 α berhubungan secara signifikan dengan respon radiasi dimana pasien dengan overekspresi HIF-1 α hanya memberikan respon parsial terhadap terapi radiasi.⁶²

Aebersold et al melaporkan bahwa overekspresi HIF-1 α terjadi pada sebagian besar pasien dengan kanker orofaring sel skuamosa serta derajat ekspresi merupakan faktor prognostik dan faktor prediksi yang signifikan pada pasien yang akan menjalani terapi radiasi kuratif. Semakin tinggi ekspresi HIF-1 α yang dinilai melalui imunohistokimia maka ketahanan (*survival*) pasien baik *local failure-free survival*, *disease-free survival* maupun *overall survival* semakin rendah.⁶³

2.5 Real Time PCR (*Polymerization Chain Reaction*)

Amplifikasi produk (amplikon) melalui metode real time PCR dapat dideteksi dan diukur selama reaksi berlangsung. Produk amplifikasi atau amplikon pada teknik PCR konvensional dideteksi setelah reaksi berlangsung melalui elektroforesis DNA pada gel agarosa. Keuntungan penggunaan real time PCR dibandingkan dengan PCR konvensional yaitu pada saat proses optimalisasi konsentrasi *template* yang akan dianalisis serta optimasi suhu *annealing* pada real time PCR dapat dilakukan bersamaan pada reaksi yang sama. Real time PCR dapat digunakan untuk menganalisis ekspresi gen (dengan menggunakan *template* RNA maupun *template* DNA) serta untuk menganalisis polimorfisme/*genotyping*.⁶⁴

Deteksi produk real time PCR dimungkinkan dengan menyertakan dalam reaksi suatu molekul fluoresens (*DNA binding dyes*) yang akan memberikan sinyal fluoresens sebanding dengan jumlah DNA yang dihasilkan. Alat *thermal cyclers* khusus digunakan untuk memonitor sinyal fluoresens yang timbul. Hasil real time PCR dapat bersifat kualitatif (ada atau tidaknya sekuens) atau kuantitatif (*number of copies of DNA*). Amplifikasi pada real time PCR terdiri dari 2 fase yaitu fase eksponensial yang diikuti oleh fase *plateau* non eksponensial, seperti terlihat pada gambar 2.9. Selama fase eksponensial, jumlah produk PCR kira-kira dua kali lipat dalam setiap siklus.⁶⁴



Gambar 2.9. Kurva fluoresens pada Real Time PCR.⁶⁴

Selama reaksi berlangsung, komponen-komponen reaksi dikonsumsi sehingga satu atau lebih komponen menjadi terbatas. Pada saat tersebut, reaksi berjalan lambat dan memasuki fase *plateau* (siklus 28 – 40). 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 berakumulasi tersebut berada dalam jumlah yang cukup, maka sinyal fluoresensi akan terdeteksi.

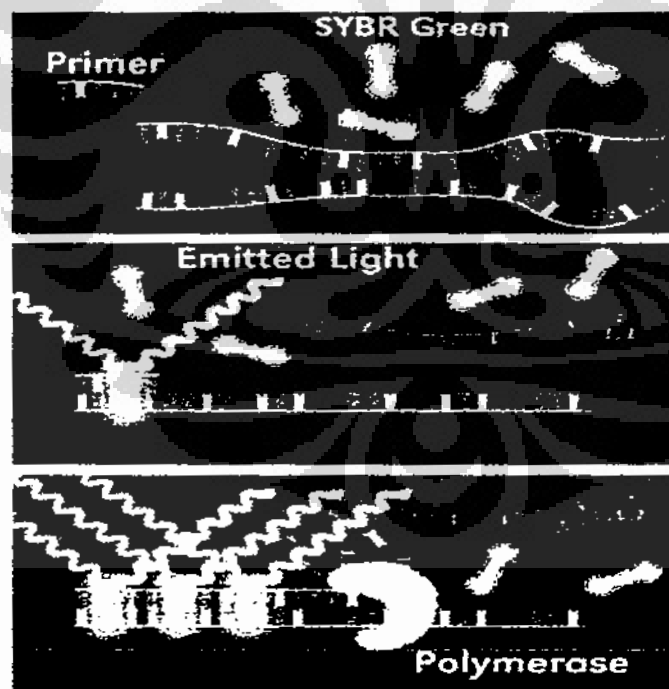
Jumlah siklus dimana sinyal fluoresens dapat terdeteksi disebut sebagai *Cycle threshold* atau *Ct*. Nilai *Ct* dari suatu reaksi terutama ditentukan oleh jumlah *template* DNA/RNA pada awal reaksi amplifikasi. Apabila terdapat *template* dalam jumlah besar pada awal reaksi, maka siklus amplifikasi yang diperlukan relatif sedikit untuk memperoleh akumulasi produk yang cukup memberikan sinyal fluoresens di atas ambang batas. Dengan demikian, reaksi tersebut akan mempunyai nilai *Ct* yang rendah atau lebih awal. Namun sebaliknya, apabila hanya terdapat jumlah *template* yang kecil pada awal reaksi, siklus amplifikasi lebih banyak diperlukan untuk memberikan sinyal fluoresens di atas ambang batas. Dengan demikian, reaksi tersebut akan mempunyai nilai *Ct* yang tinggi atau lebih lambat.⁶⁴

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 %). Langkah penting dalam menggunakan real time PCR adalah pemilihan bahan kimia fluoresensi yang akan digunakan. Bahan kimia fluoresensi dapat dikelompokkan menjadi 2 tipe utama yaitu :⁶⁴

1. Fluoresensi yang mengikat DNA (*DNA-binding dyes*) seperti SYBR Green I
2. Fluoresensi 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 fluoresensi yang kecil ketika berada dalam bentuk bebas dalam larutan, tetapi intensitas fluoresensi meningkat sampai 1000 kali ketika berikatan dengan DNA (gambar 2.10). Dengan demikian sinyal fluoresensi dari suatu reaksi real time PCR sebanding dengan jumlah dsDNA yang ada, dan sinyal tersebut akan semakin meningkat ketika terjadi amplifikasi target.



Gambar 2.10. SYBR Green I. Tampak intensitas fluoresensi SYBR Green I meningkat ketika berikatan dengan DNA untai ganda.⁶⁴

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.⁶⁴

Analisis perhitungan relatif dapat menggunakan metode Livak atau metode Pfaffl. Metode Livak digunakan apabila gen target maupun gen referens memiliki efisiensi yang mendekati 100 % dan berjarak 5 % antara satu dengan yang lain, sedangkan metode Pfaffl digunakan apabila efisiensi amplifikasi antara gen target dan gen referens tidak sama.⁶⁴

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Disain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *cross-sectional*

3.2 Tempat penelitian

Departemen Biokimia & Biologi Molekular FKUI

Tempat pengambilan sampel : RSCM, RUSPAU, RSPAD, RSKD

3.3 Subyek penelitian

Kriteria inklusi:

1. Pasien Dept. Bedah Saraf RSCM, RUSPAU, RSPAD, RSKD (Januari s/d Desember 2007) yang didiagnosis glioma dengan pemeriksaan radiologi serta menjalani operasi pengangkatan tumor.
2. Pasien bersedia menandatangani *informed consent*

Kriteria eksklusi

Hasil pemeriksaan Patologi Anatomi (PA) tidak menunjukkan glioma baik menurut klasifikasi WHO (*grade I-IV*) maupun tipe sel.

3.4 Sampel Penelitian

Sampel berupa jaringan glioma yang diambil saat pasien menjalani operasi serta darah vena (*whole blood*) yang diambil sebelum pasien menjalani terapi radiasi atau kemoradiasi.

3.5 Besar Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan data nominal dan belum pernah ada publikasi sebelumnya, sehingga rumus yang digunakan sebagai berikut :⁶⁵

$$N = \frac{Z^2_{1-\alpha/2} p(1-p)}{d^2}$$

p = 5 % = 0,05 (proporsi kejadian pasien glioma yang datang ke RSCM dalam 2 tahun terakhir)
d = ± 10 % = 0,10
N = besar sampel

Dengan demikian :

$$N = \frac{1,96^2}{0,10^2} \times 0,05(1-0,05)$$

$$= 18,25 \rightarrow 18 \text{ orang}$$

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 sampel.

3.6. Bahan dan Cara Kerja :

3.6.1 Analisis ekspresi gen MnSOD dan ekspresi gen HIF -1 α

Penentuan jumlah mRNA MnSOD dan mRNA HIF -1 α pada sel glioma dan sel leukosit pasien (metode PCR kuantitatif dengan Real-Time PCR)

3.6.1.1. Isolasi RNA total dari sel glioma dan sel leukosit pasien.

Bahan :

Pengambilan Sampel Darah :

1. Tabung EDTA
2. *Spuut* 3 cc
3. Kapas Alkohol
4. Plester

Pengambilan Sampel Jaringan :

1. Dry Ice
2. *Microtest tube* ulir

Ekstraksi RNA

1. *Total RNA Isolation Kit* (Biorad[®])
2. Isopropanol
3. Etanol 70 %
4. *Microtest tube* 1.5 ml
5. Tip biru, kuning, putih
6. Kertas saring

Cara Kerja :

Jaringan glioma diperoleh dari pasien pada operasi pengangkatan tumor (kraniotomi) dengan cara *debulking* tumor sebanyak mungkin. Jaringan tumor langsung dihomogenisasi menggunakan Polytron Homogenizer atau disimpan

dalam deep freezer pada suhu - 80°C. Sel lekosit diperoleh dari darah vena pasien sebanyak 3 mL. Setelah itu dilakukan ekstraksi RNA total dari sel glioma dan sel lekosit.

Tahap isolasi RNA dari sel glioma sebagai berikut :

Lisis Sel

Jaringan sebanyak 5-10 mg dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL yang berisi 300 µl larutan pelisis RNA. Jaringan tersebut dilumatkan dengan menggunakan *Homogenizer*.

Presipitasi Protein-DNA

Sebanyak 100 µl larutan presipitasi DNA – Protein ditambahkan ke dalam homogenat. Tabung dibalik-balikkan sebanyak 10 kali dan kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi 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 dituangkan ke dalam tabung Eppendorf baru yang berisi 300 µl isopropanol 100 %. Sesudah itu sampel dicampur dengan membalik-balikkan tabung sebanyak 25 – 30 kali. Setelah itu dilakukan sentrifugasi 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. Selanjutnya, ke dalam tabung ditambahkan 300 µl etanol 70 % dan tabung dibalik-balikkan beberapa kali untuk mencuci pellet RNA. Tabung disentrifugasi pada 13.000 – 16.000 x g selama 1 menit. Etanol/supernatan dibuang dengan hati-hati. Kemudian tabung dibalikkan di atas kertas saring serta dibiarkan kering selama 10 -15 menit

Hidrasi RNA

Lima puluh µl larutan hidrasi RNA ditambahkan pada tabung. RNA dibiarkan untuk rehidrasi paling tidak selama 30 menit dalam es. Alternatif lain, sampel RNA disimpan pada suhu - 70° sampai -80°C sampai digunakan.

Tahap isolasi RNA dari sel lekosit terdapat sedikit perbedaan yaitu pada saat lisis sel sebagai berikut :

Darah sebanyak 300 μ l ditambahkan ke dalam tabung 1,5 ml yang telah berisi 900 μ l *RBC lysis solution*. Tabung dicampur dengan dibalik-balikkan dan diinkubasi 10 menit pada suhu ruang, sesekali tabung dibalik-balikkan selama inkubasi. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 20 detik pada 13.000 – 16.000 x g. Supernatan dituang dengan pipet dan disisakan sekitar 10 -20 μ l yang mengandung pellet putih. Sisa supernatan tersebut divorteks untuk melarutkan kembali pellet putih. Kemudian ditambahkan 300 μ l RNA Lysis Solution dan dipipetkan turun naik tidak lebih dari 3 kali untuk melisiskan sel. Tahap selanjutnya yaitu Presipitasi Protein-DNA, presipitasi RNA dan hidrasi RNA seperti tahap isolasi RNA pada sel glioma.

3.6.1.2. Desain Primer

Primer gen MnSOD, HIF-1 α dan 18s rRNA didesain dengan menggunakan program Primer 3 & “*Primer Analysis*”. Sekuen MnSOD, HIF-1 α dan 18s rRNA diperoleh dari *Human Gene Bank NCBI* dengan kode NM_000636 untuk MnSOD, NM_001530 untuk HIF-1 α , dan X03205 untuk 18S rRNA (lampiran 1).

3.6.1.3. Amplifikasi cDNA menggunakan Real Time PCR

Bahan :

1. *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green* (BioRad®)
2. Primer gen MnSOD, HIF-1 α dan 18s rRNA
3. *RT PCR tube*
4. Tip biru, kuning, putih

Cara Kerja :

Amplifikasi cDNA dengan menggunakan alat Real Time PCR (MiniOpticon, BioRad®). 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 (40 siklus) selama 10 detik pada suhu 95 °C; 30 detik pada suhu 59 °C (melalui 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 dan ekspresi gen HIF-1 α secara kuantitatif. Gen 18S rRNA digunakan sebagai standar eksternal. Amplifikasi gen 18s rRNA 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 *Cycle Threshold/C(t)*. Analisis ekspresi gen dinilai secara “*relative quantification*” sehingga diperoleh nilai kadar relatif mRNA, dengan menggunakan metode Pfaffl dengan rumus sebagai berikut :⁶⁴

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

Keterangan :

Target = gen MnSOD

Test = sel glioma (uji)

Calibrator = sel leukosit (kontrol)

Ref = gen 18s rRNA (*reference gene*)

E target = Efisiensi gen MnSOD pada sel glioma

E ref = Efisiensi gen 18s rRNA pada sel glioma

$\Delta C_{t, \text{target}}$ = [C(t) *calibrator* gen MnSOD] – [C(t) *test* gen MnSOD]

$\Delta C_{t, \text{Ref}}$ = [C(t) *calibrator* gen 18s rRNA] – [C(t) *test* gen 18s rRNA]

3.6.2. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD pada Sel Glioma dan Sel Leukosit Pasien

Bahan :

1. RanSOD kit (Randox[®])
2. RanSOD Diluent (Randox[®])

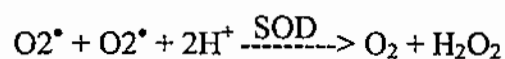
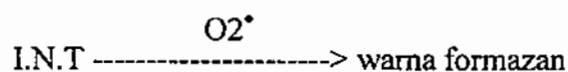
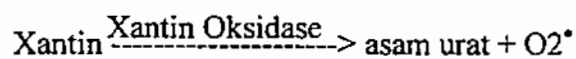
3. *Cell Lysis Solution* (Promega[®])
4. *Nuclei Lysis Solution* (Promega[®])
5. NaCN 5 mM
6. *Aquabidest*
7. *Bovine Serum Albumin* (BSA) bubuk
8. Tip biru, kuning, putih
9. Parafilm

Cara Kerja :

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD dari sel glioma digunakan homogenat glioma. Homogenat dibuat dengan menambahkan 10-20 mg jaringan dengan 600 μ l larutan pelisis inti sel (*Nuclei Lysis Solution*, Promega[®]) dalam kondisi dingin (4 °C). Kemudian dihomogenizer sampai jaringan halus. Homogenat diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Sebanyak 25 μ l dari homogenat tersebut digunakan untuk pemeriksaan aktivitas MnSOD.

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD dari sel lekosit: darah vena 200 μ l ditambahkan 600 μ l larutan pelisis sel darah merah (*Cell Lysis Solution*, Promega[®]), didiamkan selama 10 menit kemudian 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. Supernatan (sel darah merah yang lisis) dibuang, sisakan sekitar 10 μ l. Sel-sel lekosit (*pellet* putih) dilisiskan dengan larutan pelisis inti sel (*Nuclei Lysis Solution*, Promega[®]) sebanyak 200 μ l. Lisat sel lekosit diencerkan lagi 5 x dengan *buffer fosfat/RanSOD diluent* (sesuai metode kit RanSOD[®]). Sebanyak 25 μ l lisat sel lekosit yang telah ditambahkan *buffer fosfat* tersebut digunakan untuk pemeriksaan aktivitas MnSOD.

Pengukuran aktivitas MnSOD dilakukan dengan menggunakan kit RanSOD. Prinsip reaksi pada kit tersebut yaitu xantin & xantin oksidase akan membentuk radikal superoksida yang bereaksi dg 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T) sehingga terbentuk warna merah formazan.



Untuk menghambat Cu/ZnSOD, ditambahkan 5mM natrium sianida dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan xantin oksidase dan serapan cahaya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm 30 detik pertama (A1) dan 3 menit kemudian (A2). Tabel pengukuran terdapat pada lampiran 2.

Perhitungan :

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

3

$$\begin{aligned} \text{Kecepatan sample diluent (S1)} &= \text{kecepatan reaksi yang tidak diinhibisi} \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

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

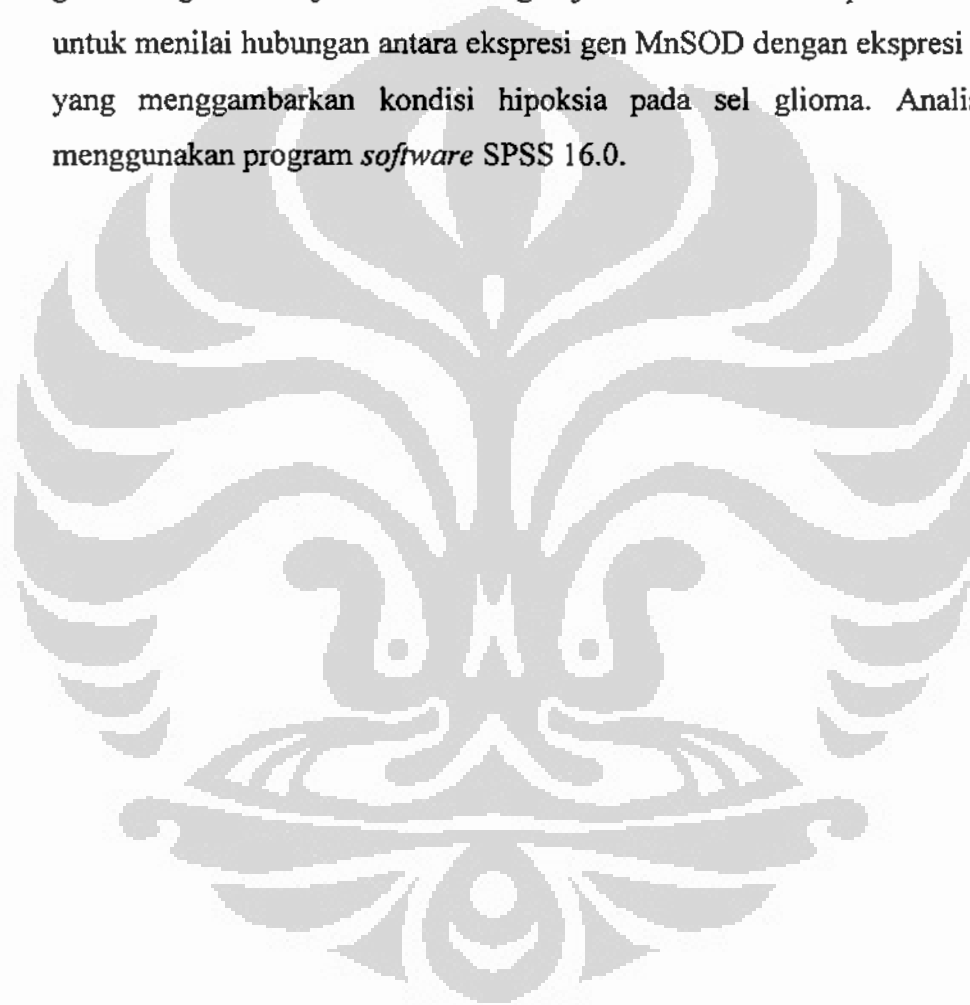
$$100 - \frac{(\Delta A \text{ sampel/mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1/mnt})}$$

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

Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sel leukosit dan sel glioma tersebut akan dihitung per mg protein sehingga dapat dibandingkan. Kadar protein dihitung pada λ 280 nm dan dibandingkan dengan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Sampel sel leukosit yang diukur kadar proteinnya yaitu dari 200 μ l lisat sel leukosit, hanya diambil 10 μ l sampel diencerkan dengan 990 μ l aquabidest (pengenceran 100 X). Begitu juga dengan sampel sel glioma yang akan diukur kadar proteinnya yaitu dari 600 μ l homogenat yang diperoleh hanya diambil 10 μ l sampel diencerkan dengan 990 μ l aquabidest (pengenceran 100 X).

III.7 Analisis Statistik

Evaluasi ekspresi gen MnSOD dan ekspresi gen HIF-1 α dilakukan dengan menggunakan analisis *chi square* (untuk data nominal) dan uji T (untuk data numerik) apabila distribusi data homogen. Namun, apabila distribusinya tidak homogen maka analisis statistik menggunakan uji Kruskal Wallis/ Mann-Whitney U. Sedangkan untuk menganalisis ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma digunakan uji tabulasi silang. Uji korelasi Pearson/Spearman's digunakan untuk menilai hubungan antara ekspresi gen MnSOD dengan ekspresi gen HIF-1 α yang menggambarkan kondisi hipoksia pada sel glioma. Analisis statistik menggunakan program *software* SPSS 16.0.



BAB IV HASIL & PEMBAHASAN

4.1. Proses Analisis Kadar Relatif mRNA MnSOD dan HIF-1 α

4.1.1 Isolasi RNA

Hasil isolasi RNA total pada sampel sel leukosit dan sel glioma diukur serapan cahayanya dengan sinar UV panjang gelombang 260 nm untuk menentukan konsentrasi RNA total. Agar hasil *Real Time Reverse Transcriptase (RT) PCR* dapat dibandingkan maka RNA total yang digunakan sebagai cetakan untuk sel glioma & sel leukosit dan semua gen perlu disamakan yaitu sebesar ~ 640 ng dengan mengatur volume dan pengenceran *template* RNA total yang digunakan pada campuran RT-PCR (lampiran 3). Hasil isolasi RNA juga dikonfirmasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1 % untuk menilai kualitas RNA (gambar 4.1).



Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis RNA sel leukosit (1-3) & sel glioma (4-5) pada gel agarosa 1 %. Sebanyak 5 μ l hasil isolasi RNA dimasukkan pada sumur elektroforesis. Tampak pita RNA utuh dan tidak terdegradasi.

4.1.2 Desain Primer

Hasil desain primer dengan program Primer 3 tampak pada tabel 4.1, secara detail terdapat pada lampiran 4. Pemilihan primer ini dilakukan dengan mempertimbangkan syarat-syarat untuk primer yaitu panjang primer antara 18 – 24 basa, komposisi basa G/C antara 40 – 60 %, sekecil mungkin terbentuknya *hairpin structure/ primer dimer* dan primer yang spesifik. Pasangan primer (*forward dan reverse*) dari setiap gen harus mempunyai T_m yang tidak boleh berbeda lebih dari 1 - 2 $^{\circ}$ C. Primer yang diperoleh dianalisis dengan program software "*Primer Analysis*" (lampiran 5) untuk mengetahui apakah primer yang diperoleh sudah sesuai dengan kriteria pemilihan primer yang baik. Hasil primer yang didesain menunjukkan bahwa primer untuk gen MnSOD, gen HIF-1 α serta

gen 18S rRNA telah sesuai dengan kriteria pemilihan primer. Produk PCR yang dihasilkan dari pasangan primer gen MnSOD sebesar 216 bp, gen HIF-1 α sebesar 157 bp serta gen 18S rRNA sebesar 155 bp. Pemilihan besar produk tersebut berdasarkan persyaratan besar amplicon untuk Real Time PCR adalah 50 – 200 bp untuk menghasilkan efisiensi yang maksimum dan hasil PCR yang baik.⁶⁶ Untuk mengetahui spesifik tidaknya primer, maka dilakukan analisis *Melting Curve* pada saat proses Real Time RT-PCR.

Tabel 4.1. Hasil Desain Primer dengan Program Primer 3

Primer	Besar Produk (bp)	Length	% GC	Tm
Gen MnSOD	216			
gcactagcagcatgttgagc (Forward)		20	55.00	59.78
acttctctcggtgacgttc (Reverse)		20	55.00	59.30
Gen HIF-1α	157			
tgatgaccagcaacttgagg (Forward)		20	50.00	59.83
ttgattgagtgcagggtcag (Reverse)		20	50.00	59.83
Gen 18S rRNA	155			
aaacggctaccacatccaag (Forward)		20	50.00	59.99
cctccaatggatcctcgta (Reverse)		20	50.00	59.89

4.1.3 Proses Amplifikasi cDNA dengan *Real Time RT PCR* untuk Analisis mRNA MnSOD & mRNA HIF-1 α

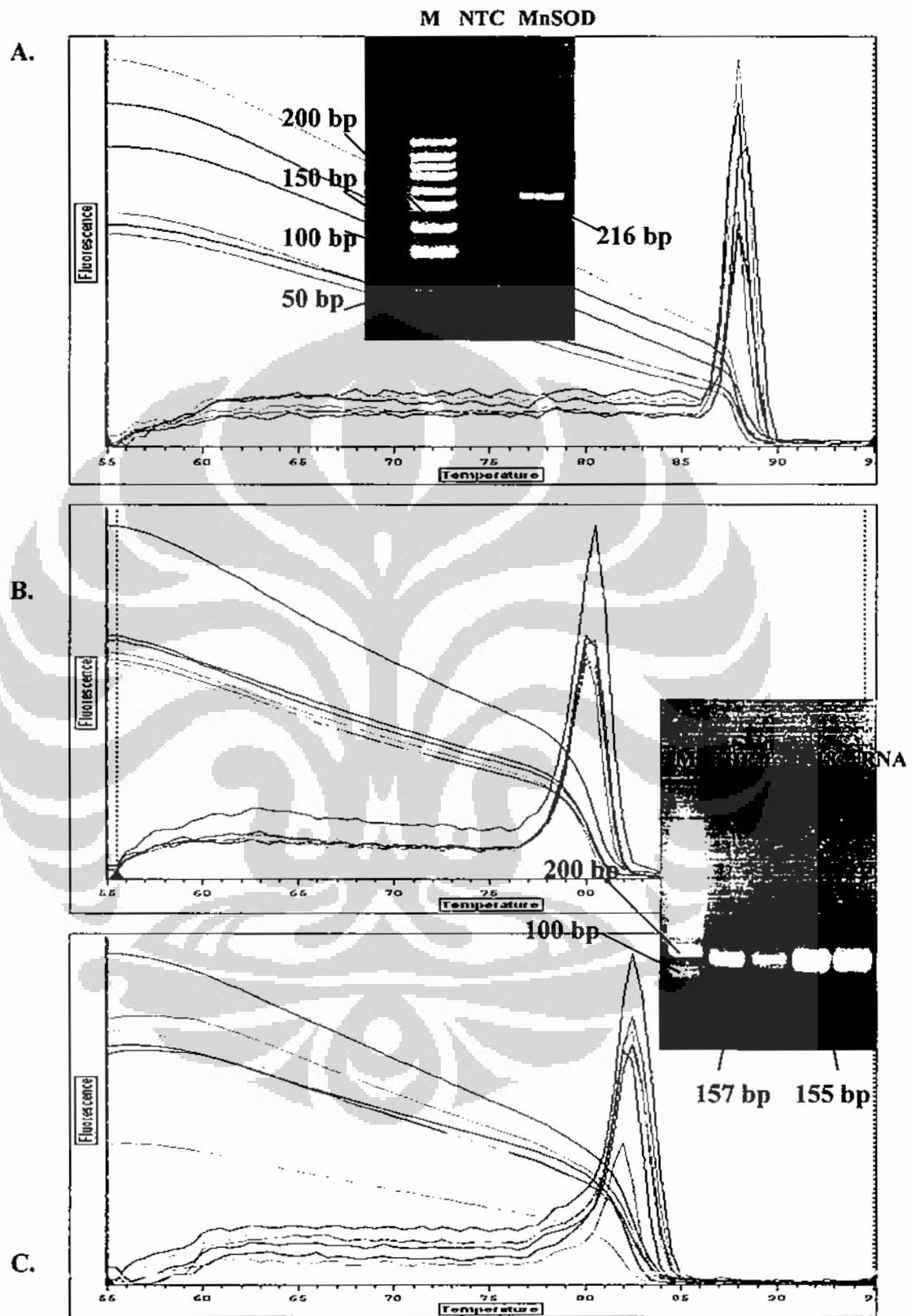
Hasil isolasi RNA dilanjutkan dengan amplifikasi cDNA dengan *Real Time Reverse Transcriptase (RT) PCR* untuk memperoleh kadar relatif mRNA MnSOD dan HIF-1 α . Sebelum proses amplifikasi sampel, maka perlu dilakukan optimalisasi suhu *annealing* serta *Melting Curve* untuk menilai spesifik tidaknya primer. Optimalisasi suhu *annealing* dilakukan dengan mengamplifikasi sampel

pada rentang suhu 55-65 °C dikarenakan T_m masing-masing primer hasil desain menunjukkan nilai sekitar 59 °C, sehingga nilai T_m 59 °C harus berada diantara rentang suhu optimasi. Hasil optimalisasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang optimal yaitu 59 °C, diperoleh dengan melihat nilai “*Cycle threshold*” atau $C(t)$ yang rendah dan mempertimbangkan efisiensi. (tabel 4.2). Tampak pada sampel E mempunyai nilai $C(t)$ yang rendah (6,72) dengan efisiensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel D. Terlihat pada tabel bahwa sampel E menunjukkan suhu optimum 59 °C.

Tabel 4.2. Hasil Optimalisasi Suhu *Annealing*

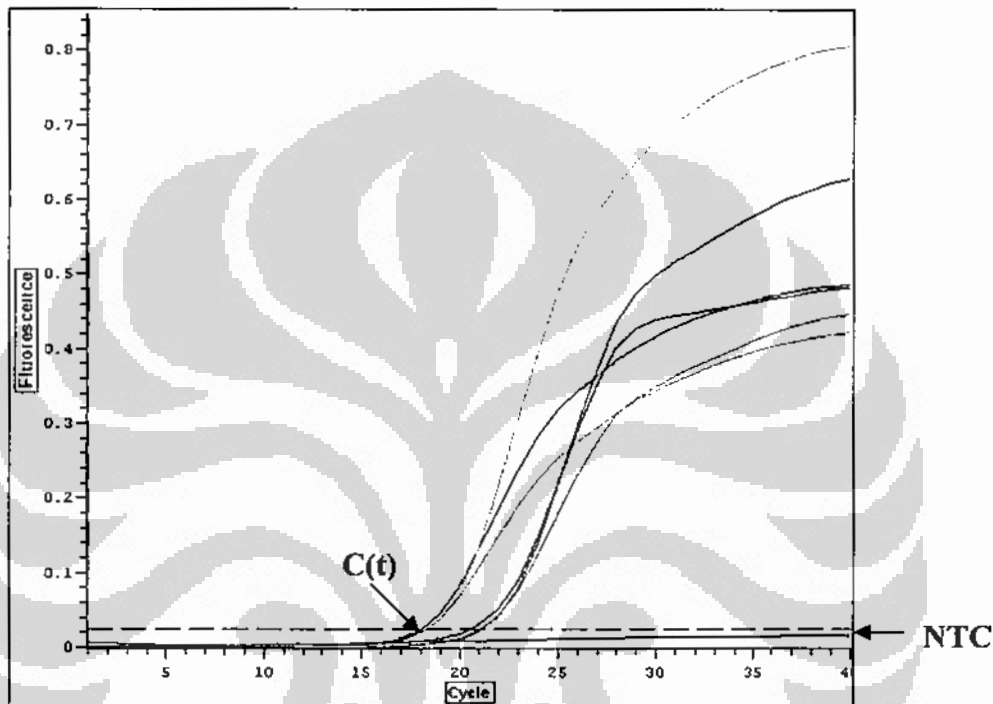
Sampel	Suhu Optimum (°C)	Efisiensi (%)	$C(t)$
A	65,0	15,11	13,91
B	64,3	17,95	22,55
C	63,0	31,72	12,76
D	61,2	22,66	5,66
E	59,0	23,26	6,72
F	57,1	6,10	22,62
G	55,8	23,59	11,51
H	55,0	11,69	5,61

Dengan melihat *melting curve* yang hanya terdapat satu puncak (gambar 4.2), maka primer MnSOD (T_m 88), HIF-1 α (T_m 80,50) & 18s rRNA (T_m 82) cukup spesifik dan layak digunakan. Begitu pula dengan produk hasil RT-PCR menunjukkan hanya satu pita pada gambaran elektroforesis gel agarosa 2 % yaitu gen MnSOD sebesar 216 bp, gen HIF-1 α sebesar 157 bp, dan gen 18s rRNA sebesar 155 bp.



Gambar 4.2. *Melting Curve* pada Real Time PCR. *Insert*: elektroforesis agarosa 2 %. Gen MnSOD (A), gen HIF-1 α (B) dan gen 18s rRNA (C). M = marker; NTC = *non template control*.

Hasil Real Time RT-PCR terdeteksi sebagai jumlah fluoresensi SYBR Green yang dapat diserap. Nilai *threshold* pada kurva fluoresensi dapat diatur agar diperoleh efisiensi ekspresi yang paling optimum, namun nilai perlu diseragamkan untuk semua kurva agar pada analisis semua data dapat dibandingkan (gambar 4.3). Nilai *threshold* yang digunakan pada analisis Real Time RT-PCR pada penelitian ini yaitu "*trend 0,025*".



Gambar 4.3. Nilai $C(t)$ merupakan perpotongan antara kurva fluoresens sampel dengan *threshold line*: NTC (*non template control*) tampak kurva fluoresens yang mendatar di bawah *threshold line*.

Nilai $C(t)$ ditentukan oleh alat Real Time PCR secara otomatis berdasarkan perpotongan kurva dengan garis *threshold* (lampiran 6). 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.

Pada penelitian ini sel leukosit dipakai sebagai kontrol sel normal dikarenakan tidak mungkin untuk mendapatkan sel otak normal dari pasien glioma, karena prinsip kraniotomi pada pasien glioma adalah mereseksi jaringan tumor sebanyak mungkin tanpa mereseksi jaringan otak normal.^{24,25}

Telah dipikirkan untuk memakai sel otak normal dari pasien lain yang tidak menderita glioma misal dari kasus bedah cedera kepala atau infeksi otak (meningitis/ ensefalitis). Namun, ekspresi gen antarorang akan berbeda sehingga akan sulit untuk dibandingkan, juga banyak faktor yang mempengaruhi ekspresi gen MnSOD dan HIF-1 α dari kasus tersebut misal faktor inflamasi. Selain itu, terpikir pula untuk menggunakan sel otak normal dari kadaver, namun hal itu juga tidak memungkinkan dikarenakan kondisi RNA pada orang hidup dan pada mayat akan berbeda. RNA sangat tidak stabil dan cepat didegradasi.⁶⁷ Selain itu, faktor “*informed consent*” pada kadaver masih dipertanyakan.

Sel otak normal dari pasien glioma sendiri memang merupakan kontrol sel normal yang paling ideal. Oleh karena hal itu tidak memungkinkan maka digunakan sel leukosit dari pasien glioma. Ekspresi gen pada sel glioma dan pada sel leukosit tersebut dapat dibandingkan dengan cara konsentrasi RNA *template* yang disamakan serta normalisasi dengan “*reference gene*”. Gen referensi yang digunakan merupakan gen yang terdapat pada semua sel dan ekspresinya konstan pada semua sel tidak dipengaruhi oleh perlakuan, dalam penelitian ini digunakan gen 18S rRNA.⁶⁶

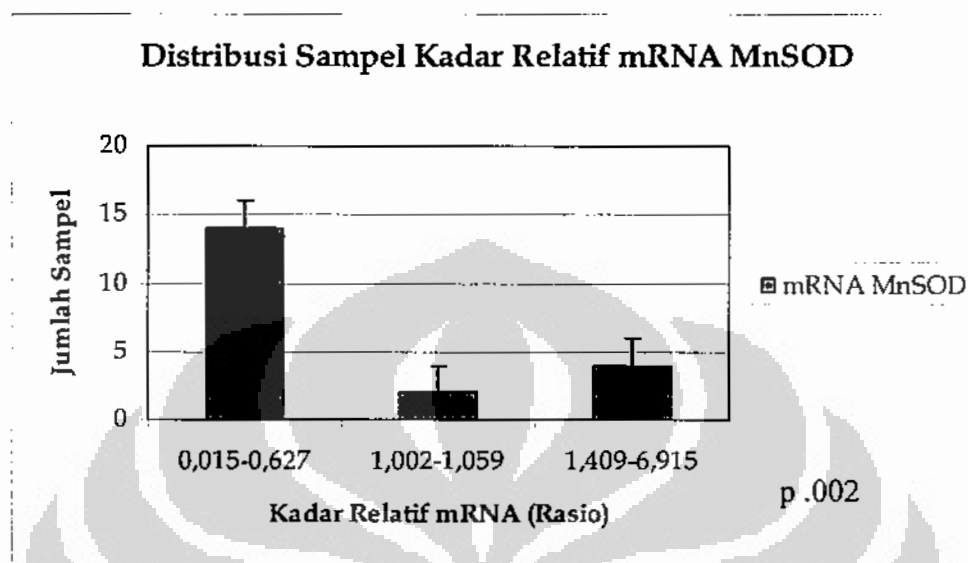
Kadar relatif mRNA (baik MnSOD maupun HIF-1 α) yang diperoleh merupakan perbandingan antara kadar relatif tersebut pada sel glioma dengan sel leukosit penderita sebagai sel normal (kontrol). Untuk menganalisis perbedaan antara ekspresi mRNA MnSOD dan HIF-1 α pada sel glioma dibandingkan dengan sel leukosit secara kuantitatif, maka dibuat pengelompokan derajat tingkat ekspresi relatif berdasarkan nilai nominal seperti terlihat pada tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3 Pengelompokan Derajat Tingkat Ekspresi Relatif

Kadar Relatif	Deskripsi
< 0,9 (menurun)	mRNA MnSOD & HIF-1 α sel glioma lebih rendah dari mRNA MnSOD & HIF-1 α sel leukosit.
0,9 – 1,1 (tetap)	mRNA MnSOD & HIF-1 α sel glioma sama dengan mRNA MnSOD & HIF-1 α sel leukosit
> 1,1 (meningkat)	mRNA MnSOD & HIF-1 α sel glioma lebih tinggi dibandingkan mRNA MnSOD & HIF-1 α sel leukosit.

4.2 Analisis Kadar relatif mRNA MnSOD

Dari 20 sampel penelitian menunjukkan kadar relatif mRNA MnSOD yang bervariasi, kebanyakan kurang dari 0,9 (gambar 4.4).



Gambar 4.4. Diagram Batang Distribusi Sampel Kadar Relatif mRNA MnSOD sel glioma yang bermakna secara statistik ($p < 0.01$).

Analisis statistik dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara ketiga kelompok distribusi sampel tersebut, yaitu sebanyak 70 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA MnSOD sel glioma 0,015 – 0,627 kali lebih rendah dibandingkan dengan sel leukosit. Sebanyak 10 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA MnSOD sel glioma 1,002-1,059 serta sebanyak 20 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA MnSOD sel glioma 1,409 – 6, 915 kali lebih tinggi dibandingkan sel leukosit sebagai kontrol sel normal. Kadar relatif mRNA MnSOD setiap sampel terdapat pada lampiran 7.

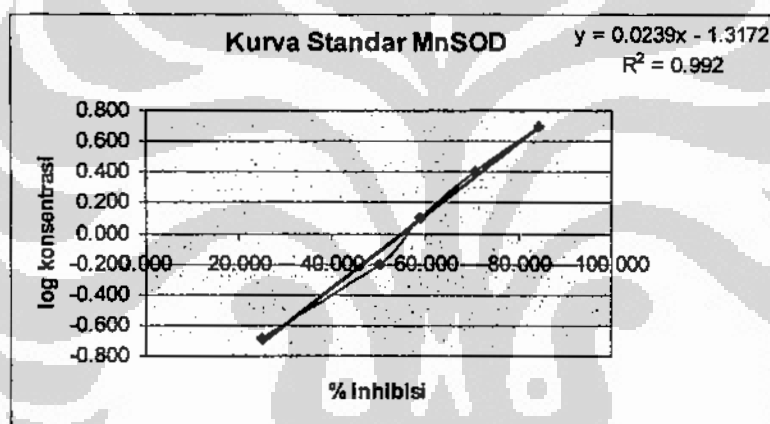
Dengan demikian, pada penelitian ini kadar relatif mRNA MnSOD pada sel glioma ditemukan menurun pada sebagian besar sampel dengan nilai yang cukup bervariasi. Penyebab rendahnya MnSOD tersebut belum dipahami sepenuhnya, mungkin disebabkan oleh perubahan genotipe pada sel tumor yaitu mutasi. Mutasi pada promotor MnSOD dapat menyebabkan perubahan mRNA MnSOD, namun sampai saat ini mutasi pada promotor MnSOD tersebut belum dilaporkan. Mutasi MnSOD yang telah dilaporkan yaitu mutasi pada 5'-*untranslated region* MnSOD yang ditemukan pada kanker payudara.³⁶

Pada penelitian ini juga dilakukan analisis aktivitas spesifik enzim MnSOD untuk mengetahui aktivitas enzim MnSOD pada sel glioma setelah diketahui mRNA MnSOD.

4.3 Analisis Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

4.3.1 Pembuatan kurva standar SOD

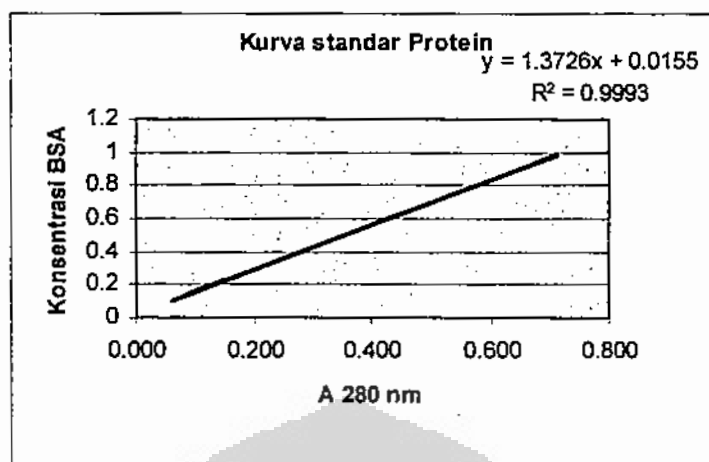
Kurva standar dibuat setiap kali pengukuran dengan menggunakan berbagai konsentrasi larutan standar SOD mulai dari 0.208 Unit; 0.625 Unit; 1.25 Unit; 2.5 Unit; 5 Unit sesuai dengan kit RanSOD. Salah satu kurva standar SOD dapat dilihat pada gambar 4.5. Hasil serapan dan % inhibisi sampel terdapat pada lampiran 8.



Gambar 4.5. Kurva semilog standar SOD. Persamaan yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar MnSOD sampel.

4.3.2 Penetapan Kadar Protein

Kurva standar protein dibuat setiap kali melakukan pengukuran dengan menggunakan berbagai konsentrasi larutan standar protein (BSA) mulai dari 0.1 mg/ml sampai dengan 1 mg/ml. Serapan standard BSA dibaca pada panjang gelombang 280 nm. Dari hasil serapan standar tersebut dapat dibuat kurva standar protein (gambar 4.6) sehingga diperoleh persamaan untuk menghitung kadar protein sampel.



Gambar 4.6. Kurva standar protein. Persamaan yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar protein sampel.

Kadar protein digunakan untuk satuan aktivitas spesifik enzim MnSOD. Hasil pengukuran kadar protein masing-masing sampel dapat dilihat pada lampiran 9.

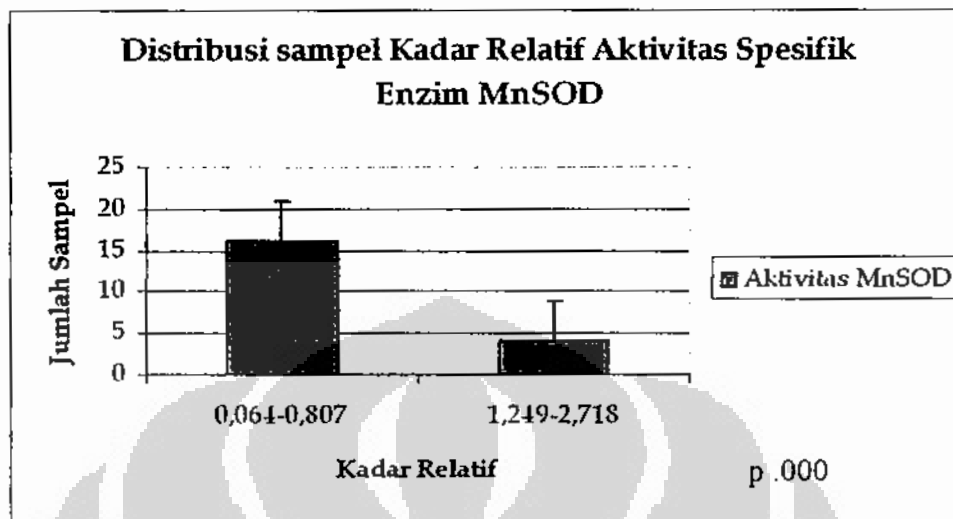
4.3.3 Penetapan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

Aktivitas spesifik enzim MnSOD dinyatakan dalam satuan Unit/mg protein. Oleh karena kadar relatif mRNA MnSOD sel glioma merupakan hasil perbandingan dengan sel leukosit, maka aktivitas spesifik enzim MnSOD yang diperoleh pada sel glioma pun dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim MnSOD sel leukosit, sehingga dapat dinilai apakah nilai mRNA MnSOD sebanding dengan nilai aktivitas enzimnya. Untuk menganalisis perbedaan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sel glioma dibandingkan dengan sel leukosit, maka dibuat pengelompokan berdasarkan nilai nominal seperti terlihat pada tabel 4.4 berikut.

Tabel 4.4 Pengelompokan Kadar Relatif Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

Kadar Relatif	Deskripsi
< 0,9 (menurun)	Aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma lebih rendah dari aktivitas spesifik enzim MnSOD sel leukosit.
0,9 – 1,1 (tetap)	Aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma sama dengan aktivitas spesifik enzim MnSOD sel leukosit
> 1,1 (meningkat)	Aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma lebih tinggi dibandingkan aktivitas spesifik enzim MnSOD sel leukosit.

Dari 20 sampel penelitian menunjukkan kadar relatif aktivitas spesifik enzim MnSOD yang bervariasi, kebanyakan kurang dari 0,9 (gambar 4.7).



Gambar 4.7. Diagram batang distribusi sampel kadar relatif aktivitas spesifik MnSOD yang bermakna secara statistik ($p < 0.01$)

Analisis statistik dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara kedua kelompok distribusi sampel tersebut yaitu sebanyak 80 % distribusi sampel penelitian menunjukkan kadar relatif aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma 0,064 – 0,807 kali lebih rendah dibandingkan dengan sel leukosit sebagai kontrol sel normal. Sebanyak 20 % distribusi sampel menunjukkan bahwa kadar relatif aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma 1,249 – 2,718 kali lebih tinggi dibandingkan sel leukosit sebagai kontrol sel normal. Aktivitas spesifik enzim MnSOD setiap sampel terdapat pada lampiran 8.

Dengan demikian, pada penelitian ini aktivitas spesifik enzim MnSOD pada sel glioma ditemukan menurun pada sebagian besar sampel. Rendahnya aktivitas enzim MnSOD dihubungkan dengan perubahan status redoks pada sel kanker. Rendahnya kapasitas antioksidan dan ketidakseimbangan oksidan-antioksidan berperan penting dalam proses “*multistage*” karsinogenesis.³⁶ Sel tumor membentuk superoksida dan jenis ROS lainnya yang mempunyai efek dalam proliferasi sel dan invasi sel tumor. Terdapat hipotesis bahwa produksi ROS yang tinggi disertai dengan rendahnya level enzim antioksidan merupakan karakteristik dari sel tumor.³⁶

Aktivitas spesifik enzim MnSOD yang rendah pada penelitian ini diduga terpakai untuk mengatasi produksi ROS yang mungkin sangat tinggi pada sel glioma. Sel tumor memproduksi ROS dalam jumlah yang banyak dikarenakan terjadi perubahan jalur metabolik pada sel tumor. NADPH oksidase sebagai penghasil ROS melalui reduksi O₂ menjadi anion superoksida diatur oleh Rac1 GTPase pada sel tumor, yang mempunyai jalur *downstream* dari Ras protoonkogen sehingga terjadi produksi ROS yang berlebihan. Pada kanker payudara, produksi ROS juga diinduksi oleh timidin fosforilase, suatu enzim yang memecah timidin menjadi timin dan 2-deoksi-D-ribosa-1-fosfat. Produk yang terakhir tersebut merupakan pereduksi gula yang sangat kuat, menyebabkan glikosilasi protein, dan membentuk ROS dalam sel kanker. Seperti telah diketahui bahwa terjadi proliferasi yang sangat cepat pada sel tumor melebihi suplai oksigen sehingga terjadi kekurangan glukosa dan hipoksia. Kekurangan glukosa diduga menyebabkan deplesi piruvat intraseluler dalam sel kanker payudara, sehingga mencegah dekomposisi dari ROS.⁶⁸

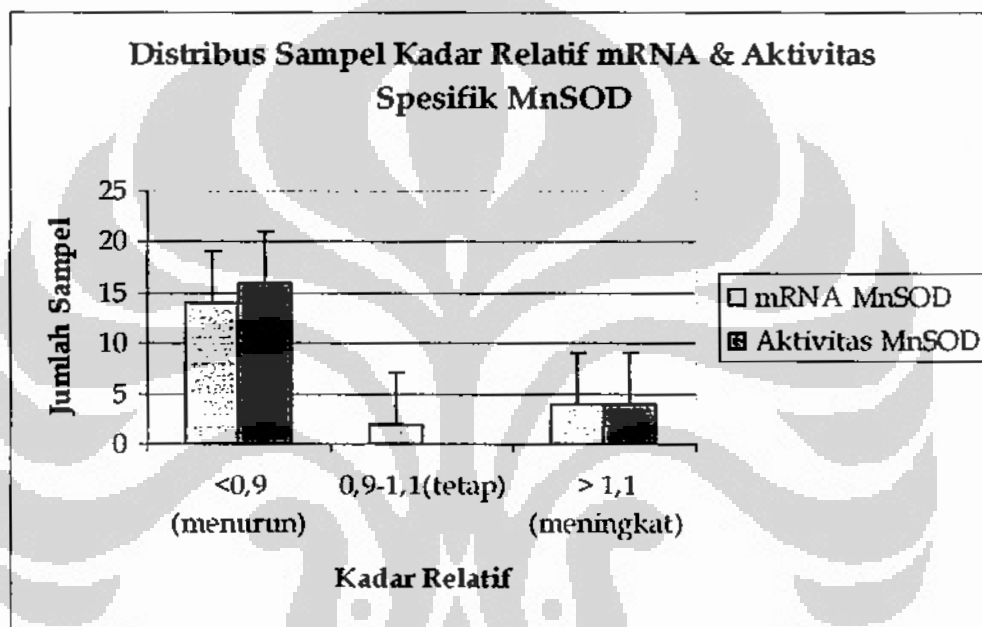
Namun diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis kadar ROS dalam sel glioma dan menganalisis hubungan antara enzim MnSOD dengan kadar ROS tersebut. Dengan demikian dapat diketahui apakah rendahnya aktivitas enzim MnSOD tersebut sebagai akibat dari peningkatan produksi ROS atau memang produksi ROS yang rendah pada sel glioma sehingga diikuti oleh aktivitas enzim MnSOD yang juga rendah.

Selain itu, rendahnya aktivitas spesifik enzim MnSOD mungkin berhubungan dengan polimorfisme genetik MnSOD. Polimorfisme genetik MnSOD yang telah dilaporkan pada populasi manusia, yaitu Ala16Val dan Ile58Thr. Pada polimorfisme Ala16Val terjadi substitusi Alanin (GCT) menjadi Valin (GTT) pada posisi 16 *mitochondrial targeting sequence* (MTS) dari MnSOD manusia yang mengubah struktur sekunder protein dari struktur heliks ke konformasi lembaran beta. Perubahan ini mempengaruhi alokasi selular enzim dan transport MnSOD ke dalam mitokondria. Sutton et al melaporkan bahwa Ala-MnSOD 30-40% lebih aktif di dalam matriks mitokondria dibandingkan dengan Val-MnSOD.⁶⁹ Polimorfisme lain, yaitu Ile58Thr pada ekson 3, dapat mempengaruhi stabilitas MnSOD sehingga mengurangi jumlah dan aktivitas

enzim.⁷⁰ Polimorfisme genetik Ala16Val MnSOD pada 'mitochondrial targeting sequence' telah dihubungkan dengan kerentanan kanker payudara, kanker kolon dan prostat.²⁹

4.4 Hubungan mRNA MnSOD dengan Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD pada Sel Glioma

Rendahnya kadar relatif mRNA MnSOD pada penelitian ini diikuti dengan rendahnya aktivitas enzim spesifik MnSOD (gambar 4.8).

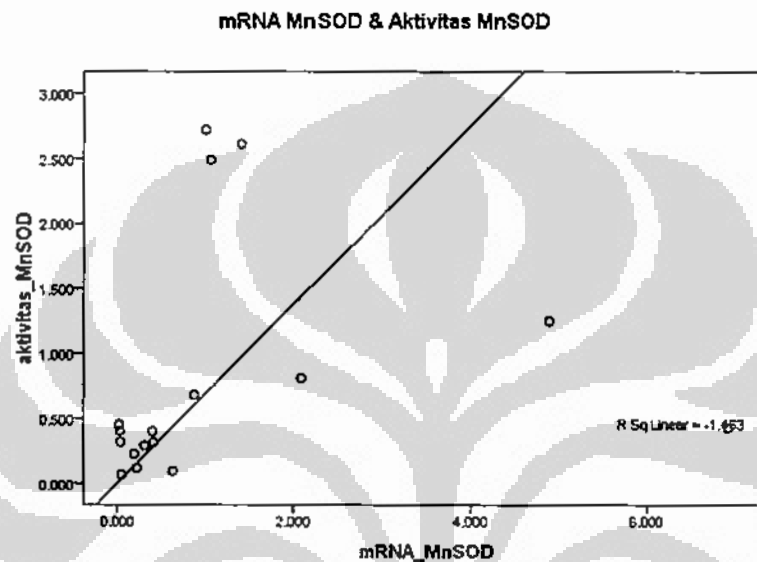


Gambar 4.8. Diagram Batang Kadar relatif mRNA & Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

Perubahan mRNA MnSOD pada sel glioma diikuti dengan perubahan aktivitas spesifik enzim MnSOD. Perubahan tersebut sejalan dan mempunyai hubungan positif kekuatan sedang ($R\ 0,699$; $p < 0.01$) yang bermakna secara statistik dengan uji korelasi Spearman's. Hal ini terlihat pada diagram scatter berikut (gambar 4.9) yang menunjukkan bahwa semakin rendah mRNA MnSOD akan diikuti oleh rendahnya aktivitas MnSOD, begitu pula sebaliknya semakin tinggi mRNA MnSOD maka aktivitas MnSOD juga akan tinggi.

Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen MnSOD pada sel glioma ditemukan rendah pada sebagian besar sampel. Hasil penelitian ini mendukung peran MnSOD sebagai supresor tumor yang secara konsisten ditemukan rendah pada beberapa sel kanker primer & galur sel kanker

(cell line).³⁶ Rendahnya kadar MnSOD ditemukan pada kanker paru manusia, kanker ginjal, kanker prostat, serta galur sel kanker payudara MCF-7.^{37,40} Penelitian Landriscina et al terhadap 33 tumor otak neuroepitelial memperlihatkan hasil bahwa kadar MnSOD ditemukan rendah pada 30 % sampel tumor otak *grade* IV.⁷¹



Gambar 4.9. Diagram Scatter mRNA MnSOD dengan Aktivitas MnSOD

Dugaan MnSOD sebagai supresor tumor berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan bahwa fenotif sel kanker dapat ditekan dengan peningkatan konsentrasi enzim MnSOD dalam sel.³⁶ Produk gen tumor supresor berfungsi sebagai regulator negatif pertumbuhan sel tumor, dan hilangnya fungsi tersebut menyebabkan ekspresi sel yang secara fenotif bertransformasi ke arah keganasan.⁷² Kemungkinan peran MnSOD sebagai supresor tumor berdasarkan beberapa penelitian dengan sel yang ditransfeksi dengan gen MnSOD untuk meningkatkan aktivitas MnSOD. Peningkatan ekspresi MnSOD melalui transfeksi gen MnSOD tersebut dapat menekan pertumbuhan tumor baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.³⁶

Sebanyak 20 % sampel ekspresi MnSOD baik kadar relatif mRNA maupun aktivitas spesifik MnSOD sel glioma menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel leukosit. Beberapa penelitian juga menunjukkan hasil bahwa ekspresi MnSOD ditemukan tinggi pada beberapa kanker manusia. Level

MnSOD secara langsung berkorelasi dengan derajat keganasan (*grade*) beberapa tumor serta MnSOD yang tinggi berhubungan dengan prognosis buruk.^{12,13} Penelitian Cobb et al menggunakan pewarnaan imunohistokimia untuk menganalisis 42 spesimen dari tumor otak manusia dan 3 kontrol otak normal dengan suatu antibodi poliklonal yang mengenali MnSOD manusia. Pengukuran MnSOD dilakukan pada cairan serebrospinal (CSF) dari 14 pasien dengan tumor otak dan 7 pasien kontrol menggunakan ELISA. Tumor otak malignan, termasuk tumor metastatik otak, memperlihatkan tanda imunoreaktivitas terhadap intraseluler MnSOD, dalam matriks ekstraseluler dan dalam sel endotelial tumor. Astrocitoma grade IV (glioblastoma), astrocitoma grade III, dan medulloblastoma sangat imunoreaktif, sedangkan astrocitoma grade II kurang imunoreaktif. Analisis ELISA sampel CSF dari pasien dengan tumor malignan juga menunjukkan level protein MnSOD yang tinggi, meningkat sampai 45 kali lebih besar daripada level sampel CSF kontrol.¹²

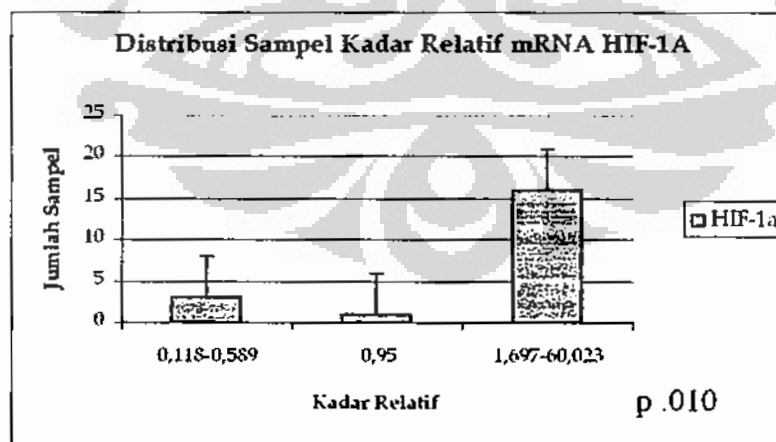
Penyebab tingginya MnSOD tersebut diduga merupakan mekanisme tumor CNS untuk bertahan terhadap radiasi dan beberapa agen kemoterapi. Sel yang secara konstitutif memproduksi MnSOD endogen atau yang dirancang mengekspresikan level tinggi MnSOD lebih resisten terhadap sitotoksitas dan kerusakan DNA yang diinduksi oleh radiasi ionisasi.³⁴ Penelitian Takada et al menyebutkan bahwa peningkatan ekspresi MnSOD dapat menyebabkan resistensi terapi radiasi. Peningkatan ekspresi MnSOD akan memperpendek fase G2-M (*Growth 2 to Mitosis*). Sel dalam fase G2-M dari proses proliferasi adalah kelompok sel yang radiosensitif antara lain berhubungan dengan target utama kematian sel yaitu DNA. Dalam kedua fase tersebut didapatkan jumlah DNA yang terbanyak. Sehingga apabila suatu sel keluar lebih awal dari fase G2 maka sel menjadi lebih resisten dan pertumbuhan baru sel (mitosis) lebih cepat terjadi.⁷³

MnSOD menetralkan O_2^\bullet menjadi H_2O_2 dan O_2 , sehingga galur sel tumor yang mengekspresikan level tinggi MnSOD diduga akan meningkatkan resistensinya terhadap obat kemoterapi yang tergantung toksisitas O_2^\bullet (adriamisin, mitomisin C, dan vinkristin). Toksisitas O_2^\bullet mitokondrial adalah suatu mekanisme penting bagi aksi beberapa agen kemoterapi yang digunakan dalam terapi neoplasma CNS malignan.¹²

Dengan demikian tingginya ekspresi MnSOD pada sebagian kecil sampel penelitian ini mungkin berhubungan dengan derajat keganasan tumor maupun dengan respon sel tumor terhadap terapi. Beberapa studi memprediksi bahwa glioma malignan secara konstitutif mengekspresikan MnSOD level tinggi akan resisten terhadap TNF α endogen (sitokin yang memediasi pembunuhan sel tumor).¹² Apabila hal tersebut ditemukan benar secara *in vivo* tumor yang memproduksi MnSOD mungkin merupakan suatu usaha tumor dalam menghindarkan diri dari mekanisme *imunosurveilen*.

4.5 Analisis Kadar Relatif mRNA HIF-1 α

Kadar relatif mRNA HIF-1 α diperoleh nilai yang bervariasi, namun kebanyakan lebih dari 1,1 (gambar 4.10). Analisis statistik dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara ketiga kelompok distribusi sampel tersebut, yaitu sebanyak 80 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA HIF-1 α sel glioma 1,697 – 60,023 kali lebih tinggi dibandingkan dengan sel leukosit. Sebanyak 5 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA HIF-1 α sel glioma 0,95 serta sebanyak 15 % distribusi sampel menunjukkan kadar relatif mRNA HIF-1 α sel glioma 0,118 – 0,589 kali lebih rendah dibandingkan sel leukosit sebagai kontrol sel normal. Kadar Relatif mRNA HIF-1 α setiap sampel terdapat pada lampiran 7.



Gambar 4.10. Diagram Batang Distribusi Sampel Kadar Relatif mRNA HIF-1 α yang bermakna secara statistik ($p < 0.05$).

Penelitian sebelumnya di Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI pada jaringan jantung, otak, dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik menunjukkan bahwa mRNA HIF-1 α pada berbagai jaringan tersebut semakin meningkat apabila perlakuan hipoksia diteruskan sampai 14 hari. Begitu pula dengan aktivitas HIF-1 α ditemukan meningkat seiring dengan peningkatan mRNA HIF-1 α .⁷⁴ Dengan demikian, peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α pada penelitian ini menunjukkan terdapatnya kondisi hipoksia pada sebagian besar sel glioma.

Hipoksia pada sel tumor terjadi karena terdapatnya area nekrotik, tertutupnya/ *'blocking'* pembuluh darah oleh sel tumor dari sirkulasi darah, kolapsnya pembuluh darah akibat tekanan intersisial tumor yang tinggi, dan/atau interupsi dari aliran darah tumor. Semua faktor-faktor tersebut terjadi karena sifat alami tumor yang rapuh, tidak teratur serta kaotik apabila dibandingkan dengan pembuluh darah jaringan normal. Proliferasi sel tumor yang begitu cepat disertai dengan terbentuknya area yang nekrotik dikarenakan jarak dimana oksigen masih dapat berdifusi dalam jaringan yaitu sekitar 150 μm .⁵³

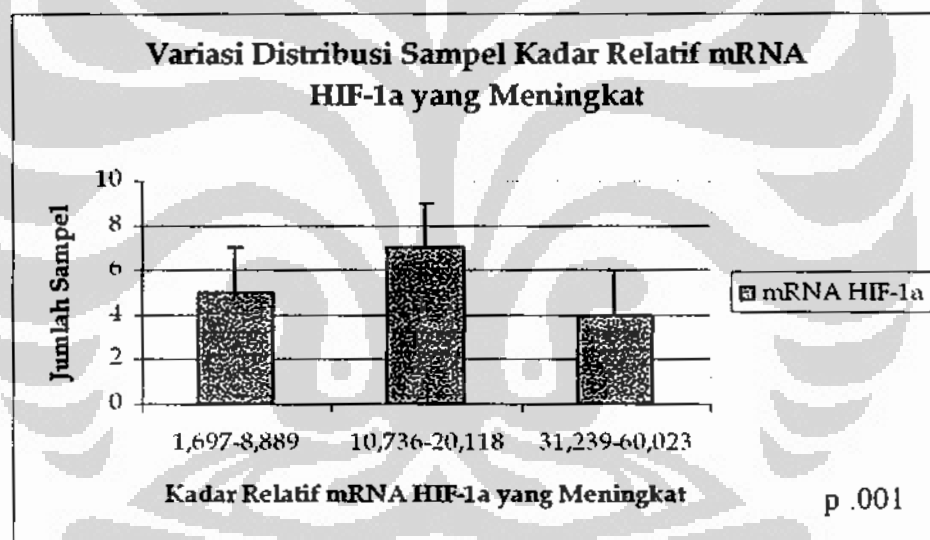
Tingginya mRNA HIF-1 α pada penelitian ini menunjukkan suatu respon adaptif sel glioma terhadap hipoksia, sehingga sel glioma dapat bertahan hidup dalam kondisi yang hipoksik. Evans et al menunjukkan bahwa *mikroenvironment* yang hipoksik pada tumor glia dapat mencetuskan modifikasi epigenetik *post* translasi pada gen tumor supresor seperti p53. Perubahan ini akan menghasilkan disregulasi aktivitas translasi dan *downstream pathway* tumor glia.⁷⁵ Dimerisasi antara HIF-1 α dan HIF-1 β akan memediasi pertahanan sel tumor dalam kondisi hipoksia melalui modulasi lebih dari 40 gen yang terlibat dalam homeostatis glukosa, eritropoiesis, proliferasi, apoptosis, dan angiogenesis.⁵⁷

Tingginya kadar relatif mRNA HIF-1 α diduga akan mengurangi sensitivitas sel glioma terhadap terapi radiasi karena terapi radiasi memerlukan oksigen. Bachtary et al melaporkan bahwa pada kanker serviks, overekspresi HIF-1 α berhubungan secara signifikan dengan respon radiasi dimana pasien dengan ekspresi HIF-1 α yang berlebihan hanya memberikan respon parsial terhadap terapi radiasi.⁶² Selain itu, peningkatan kadar HIF-1 α pada kanker

serviks dan kanker orofaring berhubungan dengan *survival* pasien, dimana pasien yang mengekspresikan HIF-1 α lebih tinggi mempunyai *survival* yang rendah.^{62,63}

Dikarenakan rentang peningkatan kadar relatif mRNA sangat besar (1,697-60,023), maka kadar relatif mRNA HIF-1 α yang meningkat dibagi menjadi 3 kelompok (gambar 4.11) untuk memberikan gambaran bahwa peningkatan HIF-1 α sangat bervariasi yaitu :

- Kadar relatif mRNA HIF-1 α sel glioma 1,2 – 10,1 kali lebih tinggi terdapat pada 25 % sampel
- Kadar relatif mRNA HIF-1 α 10,2 – 20,1 kali lebih tinggi terdapat pada 35 % sampel.
- Kadar relatif mRNA HIF-1 α yang melebihi 20,1 kali lebih tinggi terdapat pada 20 % sampel.



Gambar 4.11. Diagram Batang Variasi distribusi sampel peningkatan kadar relatif mRNA HIF-1 α yang bermakna secara statistik ($p < 0.01$)

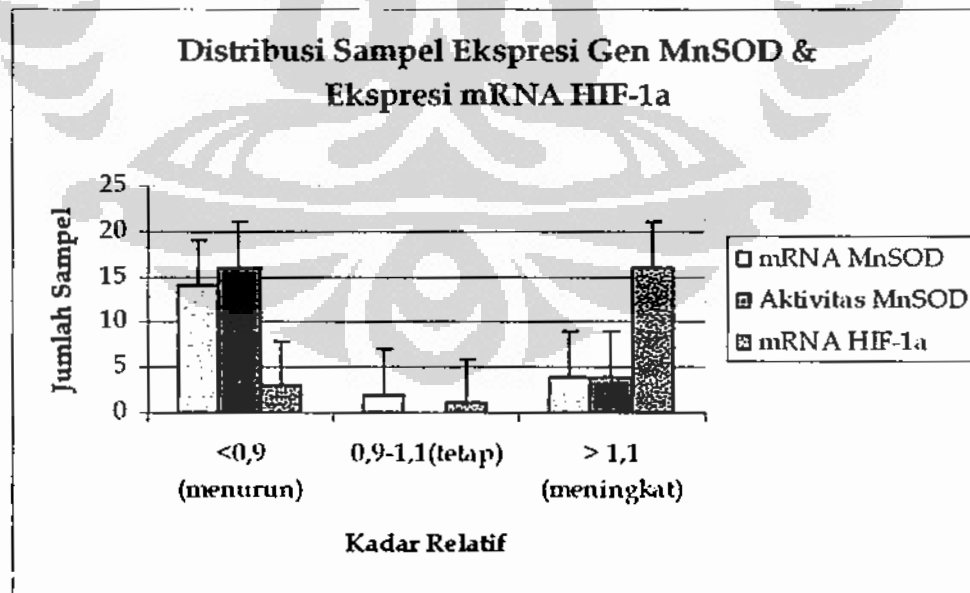
Variasi tingginya kadar relatif mRNA HIF-1 α tersebut bermakna secara statistik ($p < 0.01$) dengan uji Kruskal Wallis. Variasi peningkatan mRNA HIF-1 α tersebut menunjukkan perbedaan derajat hipoksia pada sel glioma, yang mungkin berhubungan dengan perbedaan respon sel glioma terhadap terapi radiasi. Dengan demikian variasi peningkatan kadar relatif mRNA HIF-1 α tersebut mungkin dapat menjelaskan penelitian yang telah dilakukan oleh Renindra pada pasien glioma RSCM yang menunjukkan terdapatnya variasi respon terapi radiasi yang luas pada

kelompok glioma dengan derajat keganasan yang sama.¹⁴ Namun, penelitian lanjutan yang menganalisis hubungan ekspresi gen HIF-1 α dengan derajat keganasan perlu dilakukan untuk mendukung pernyataan tersebut..

Pada sebagian kecil sampel (15 %) ditemukan ekspresi mRNA HIF-1 α yang lebih rendah dibandingkan dengan sel leukosit sebagai kontrol sel normal, serta 5 % sampel yang ekspresinya tidak mengalami perubahan (tetap). Ekspresi mRNA HIF-1 α yang rendah dan tetap tersebut belum tentu tidak menunjukkan hipoksia pada sel glioma, karena mungkin saja terjadi hambatan degradasi HIF-1 α pada sampel tersebut. Hambatan degradasi HIF-1 α akan menyebabkan stabilisasi HIF-1 α . Oleh karena itu penelitian lanjutan yang menganalisis aktivitas HIF-1 α diperlukan untuk membuktikan dugaan tersebut.

4.6 Ekspresi Gen MnSOD pada Hipoksia Sel Glioma

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar sel glioma yang hipoksia disertai dengan ekspresi gen MnSOD yang menurun. Hal ini terlihat pada diagram batang (gambar 4.12) yang menunjukkan kadar relatif ekspresi gen MnSOD sel glioma menurun sedangkan kadar relatif mRNA HIF-1 α meningkat pada sebagian besar sampel.



Gambar 4.12. Diagram batang perbandingan antara Kadar Relatif Ekspresi Gen MnSOD dan Ekspresi mRNA HIF-1 α

Uji statistik Tabulasi Silang yang menganalisis ekspresi gen MnSOD dengan ekspresi mRNA HIF-1 α setiap sampel, menunjukkan nilai yang bermakna secara statistik ($p < 0.05$ untuk analisis antara mRNA MnSOD dengan mRNA HIF-1 α). Namun kurang bermakna untuk hubungan aktivitas enzim MnSOD dengan mRNA HIF-1 α ($p < 0.1$). Dari uji statistik tersebut dapat diketahui distribusi sampel seperti terlihat pada tabel 4.5 dan tabel 4.6 berikut:

Tabel 4.5. Tabel Tabulasi Silang antara mRNA MnSOD & mRNA HIF-1 α

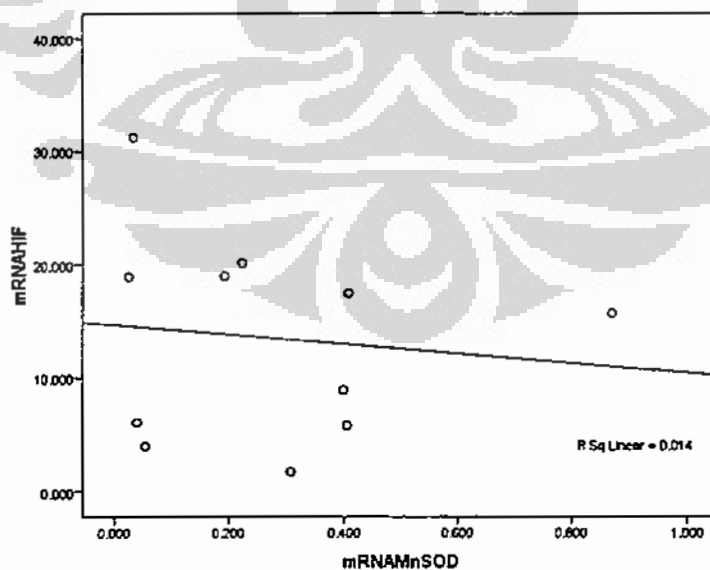
		Rasio_HIF			Total
		Meningkat	Tetap	Menurun	
Rasio_mRNA MnSOD	meningkat	4 (25 %)	0	0	4
	Tetap	1 (6.25 %)	1	0	2
	Menurun	11 (68.75 %)	0	3	14
Total		16	1	3	20

Tabel 4.6. Tabel Tabulasi Silang antara aktivitas MnSOD & mRNA HIF-1 α

		Rasio_HIF			Total
		meningkat	Tetap	Menurun	
Rasio_aktivitas MnSOD	meningkat	3 (18.75 %)	1	0	4
	menurun	13 (81.25 %)	0	3	16
Total		16	1	3	20

Kedua tabel tersebut menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α pada sebagian besar sampel (80 %) yang menunjukkan terjadinya hipoksia pada sel glioma tidak selalu diikuti oleh peningkatan ekspresi gen MnSOD, bahkan lebih banyak disertai dengan penurunan ekspresi gen MnSOD (68,75 %). Penurunan ekspresi gen MnSOD mungkin disebabkan karena konsumsi enzim MnSOD yang berlebihan dalam mengatasi ROS yang sangat meningkat pada kondisi hipoksia sel glioma. Penelitian Russel et al menyebutkan bahwa aktivitas MnSOD pada mencit jantan dalam kondisi hipoksia (10 % oksigen selama 7 hari) menurun secara signifikan.²⁰ Begitu pula dengan penelitian

Wanandi et al di Dept.Biokimia & Biologi Molekuler FKUI, yang menunjukkan bahwa ekspresi gen MnSOD menurun pada otak tikus yang diinduksi hipoksia sistemik sampai 21 hari dibandingkan dengan kontrol dan kelompok tikus yang diinduksi hipoksia 3, 7 dan 14 hari.⁷⁴ Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi hipoksia yang berat maka ekspresi gen MnSOD akan menurun yang diduga sebagai akibat produksi ROS yang berlebihan. Pada keadaan hipoksia tersebut terjadi peningkatan produksi ROS oleh mitokondria, yang akan memberi sinyal pada stabilisasi HIF-1 α . Kondisi hipoksia menurunkan konsumsi oksigen pada sitokrom c oksidase (kompleks IV mitokondria), sehingga terjadi akumulasi ROS pada kompleks III mitokondria.⁵⁷ Schumacker et al melaporkan bahwa hipoksia menstimulasi pelepasan ROS dari mitokondria yang kemudian dapat meregulasi respon transkripsi dan *post* transkripsi terhadap kondisi oksigen yang rendah. Penghambatan ROS pada hipoksia, menghambat respons transkripsi terhadap hipoksia.⁷⁶ Namun analisis statistik korelasi Spearman's pada 68,75 % sampel glioma yang hipoksia yang disertai dengan penurunan ekspresi gen MnSOD tersebut, menunjukkan tidak ada hubungan antara rendahnya ekspresi gen MnSOD dengan kondisi hipoksia sel glioma (nilai R -0,261; p > 0,1). Diagram scatter antara ekspresi mRNA MnSOD dengan ekspresi mRNA HIF-1 α terlihat pada gambar 4.13.



Gambar 4.13. Diagram scatter antara ekspresi mRNA MnSOD yang rendah dengan ekspresi mRNA yang tinggi pada 68,75 % sampel.

Dengan demikian rendahnya ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma tersebut mungkin lebih dipengaruhi oleh mekanisme yang lain selain mekanisme hipoksia, misalnya karena pengaruh mutasi/polimorfisme pada sel glioma sehingga sintesis MnSOD menurun.

Selain itu terdapat hal yang menarik yaitu pada sejumlah kecil sampel (25 %) ditemukan peningkatan ekspresi gen MnSOD yang disertai dengan peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α . Dengan kata lain, ekspresi gen MnSOD yang meningkat ditemukan pada sel glioma yang hipoksia. Hal ini menunjukkan perbedaan ekspresi gen MnSOD pada keadaan hipoksia sel glioma. Perbedaan ekspresi gen MnSOD tersebut mengindikasikan bahwa terdapat mekanisme lain yang berpengaruh terhadap ekspresi gen MnSOD selain jalur hipoksia. Penelitian Chang et al menyebutkan bahwa hipoksia menurunkan aktivitas SOD (baik CuZnSOD maupun MnSOD) pada sel glioma tikus yang diinduksi hipoksia (melalui inkubasi dengan gas nitrogen selama 15 jam).²¹ Namun, Chang et al menyebutkan bahwa SOD pada sel glioma tikus yang diinduksi hipoksia tersebut dapat diaktifkan untuk mengkompensasi kerusakan sel akibat radikal bebas selama stres hipoksia.²¹ Oleh karena itu mungkin pula peningkatan ekspresi gen MnSOD yang disertai dengan peningkatan hipoksia pada sebagian kecil sampel glioma merupakan respon adaptasi sel glioma yang hipoksia untuk mengkompensasi kerusakan sel akibat radikal bebas selama stres hipoksia.

Seperti telah diuraikan bahwa kondisi hipoksia pada sel glioma diduga akan menurunkan respon terapi radiasi karena terapi radiasi memerlukan oksigen. Namun peran MnSOD dalam mempengaruhi respon sel glioma terhadap terapi radiasi melalui jalur hipoksia belum dapat disimpulkan, oleh karena tidak terdapat korelasi antara ekspresi mRNA MnSOD dengan mRNA HIF-1 α .

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Ekspresi gen MnSOD pada sebagian besar sampel sel glioma ditemukan lebih rendah yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan sel leukosit sebagai kontrol sel normal.
- b. Terdapat hipoksia pada sebagian besar sampel sel glioma yang ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 α pada sebagian besar sampel sel glioma yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan sel leukosit sebagai kontrol sel normal.
- c. Terdapat perbedaan ekspresi gen MnSOD pada kondisi hipoksia sel glioma.

5.2 Saran

- a. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai peran MnSOD sebagai supresor tumor dengan menganalisis proliferasi sel dan indeks apoptosis
- b. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis variasi genom MnSOD pada sel glioma dibandingkan dengan variasi genom MnSOD pada sel leukosit.
- c. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kaitan rendahnya ekspresi MnSOD dengan stres oksidatif
- d. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan ekspresi MnSOD dan ekspresi HIF-1 α dengan derajat keganasan serta respon terapi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Padmosantjojo RM. Brain Tumors in Indonesia. Proceedings of the 17th Asia Pasific Cancer Congress; 2003; Bali, Indonesia
2. Schulz-Ertner D, Debus J, Lohr F, Frank C, Hoss A, Wannemacher M. Fractionated stereotactic conformal radiation therapy of brain stem gliomas: outcome and prognostic factors. *Radiother.Oncol.* 2000; 57:215-23.
3. Kanzawa T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Current and future gene therapy for malignant gliomas. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2003; 1:25-34.
4. Halliwell B, Gutteridge. Free radical in biology and medicine. JMC: Oxford University Press; 1998;107-22.
5. Robinson BH. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inherit Metab Dis.* 1998; 21:598-603.
6. Remmen HV et al. Life-long reduction in MnSOD activity result in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics.* 2005; 16:29-37.
7. Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging?. *Free Radic Biol Med.* 1990;523-39.
8. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. Radiation Research Laboratory, The University of Iowa City, USA. 1997;14(4):481-90.
9. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS et al. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *National Academy of Science.* 1993; 90(7): 3113-7.
10. Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Occhiello A, Pica A et al. Tumor suppressive activity of a variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *International Journal of Cancer.* 2006; 119(4):932-43.
11. Epperly M, Bray J, Kraeger S, Zwacka R, Engelhardt J, Travis E et al. Prevention of late effect of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase. *Gene Therapy.* 1998; 5:196-208.

12. Cobbs CS, Levi DS, Aldape K & Israel MA. Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 1996;56:3192-5.
13. Nakano T, Oka K, Taniguchi N. Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res.* 1996; 56:2771-5.
14. Aman RA. Identifikasi faktor prediksi radiosensitivitas tumor sel glia: tinjauan khusus pada angiogenesis, proliferasi sel dan apoptosis sebagai perangan biologik tumor. [Disertasi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
15. Vaupel P. Oxygen transport in tumors: characteristics and clinical implications. *Adv Exp Biol.* 1996; 388:341-51.
16. Giatromanolaki A, Harris AL. Tumour hypoxia, hypoxia signalling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(6B):4317-24
17. Bristow RG, Hill RP. Molecular and cellular basis of radiotherapy. In: Tannock IF, Hill PH, editors. *The basic science of oncology*. New York: Mc. Graw-Hill. Inc. Company, 1998; p. 295-321.
18. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36(1):1-12.
19. Haddad JJ. Oxygen sensing mechanism and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res.* 2002; 3:1-27.
20. Russel WJ, Ho YS, Jackson RM. Effects of hypoxia on MnSOD expression in mouse lung. *Am J Physiol.* 1995; 2(1):221-6
21. Chang CK, Tsai CY, Lin LS, Jou SB, Liao SS, Cheng JT. Changes of superoxide dismutase (SOD) mRNA and activity in response to hypoxic stress in cultured Wistar rat glioma cells. *Neuroscience.* 1997; 232:115-8.
22. Glioma. <http://www.wikipedia.com>.
23. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J med.* 2001;114-23.

24. Kulkurani AV, Bernstein M. Stereotactic Biopsy. In: Bernstein, Berger, editors. Neurooncology the essentials. New York: Thieme, 2000; p. 122-9.
25. Salzman M. Supratentorial gliomas: Clinical features and surgical therapy. In: Wilkins, Rengarchary, editors. Neurosurgery. McGraw-Hill, 1996; p. 777-88.
26. Withers HR. Biologic basis of radiation therapy. In: Perez CA, Brady LW, editors. Principle and practice of radiation oncology. Philadelphia: JB Lippincott Co, 2007; p. 76-104.
27. Williams BA. Treatment options for glioblastoma and other gliomas [paper]. Fairview Press; 2007.
28. Luo J. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) [paper]. Iowa: The University of Iowa; 2001.
29. Clair DS. Manganese superoxide dismutase: genetic variation and regulation. J.Nutr. 2004; 134:3190-1.
30. Borgstahl GEO, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF, Hallewell RA, Tainer JA. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. Cell. 1992; 71:107-18.
31. Reth M. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: Halliwell B, Gutteridge JMC editors. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press Inc., 2007; p. 46-87.
32. Macmillan CL, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease, Free RadicRes. 2001; 34:325-36.
33. Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor- κ B and activated protein-1. J Biol Chem. 1998; 273:13245-54.
34. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs and ionizing radiation. FASEB J. 1993; 7: 361-8.
35. Du C. Controlling tumor growth by modulating endogenous H₂O₂ [paper]. The University of Iowa; 2005.

36. Oberley LW & Oberley TD. Role of antioxidant enzymes in the cancer phenotype. In: Clerch LB & Massaro DJ, editors. Oxygen, gene expression and cellular function (Lung Biology in Health and Disease). New York: Marcel Dekker Inc, 1997; p. 279-307.
37. Li JJ, Oberley LW, St. Clair DK, Ridnour LA & Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene* 1995;10: 1989-2000.
38. Yan T, Oberley LW, Zhong W & St. Clair DK. Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SV40-transformed human lung fibroblasts. *Cancer Res.* 1996; 56: 2864-71.
39. Clair DK, Wan XS, Oberley TD, Muse KE & St Clair WH. Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by overexpression of mitochondrial superoxide dismutase. *Mol Carcinogen.* 1992; 6:238-42.
40. Venkataraman S, et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene.* 2005; 24:77-89.
41. Safford SE, Oberley TD, Urano M & St. Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 1994; 54: 4261-5.
42. Melendez JA, Melathe RP, Rodriguez AM, Mazurkiewicz JE, Davies KJ. Nitric oxide enhances the manganese superoxide dismutase-dependent suppression of proliferation in HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cells Growth Differ.* 1999; 10:655-64.
43. Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE, Melendez JA. Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state level of H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29:801-13.
44. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2000; 60:3927-39.
45. Chen QM, Liu J, Merrett JB. Apoptosis of senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem. J.* 2000; 347:543-51.

46. Barnouin K, et al. H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:13761-70.
47. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30:1191-1212.
48. Kiningham KK & St Clair DK. Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* 1998; 57 : 5265-71.
49. University of Pittsburgh Medical Center. Gene therapy may protect normal tissues during radiation retreatment for lung cancer. News Bureau Pittsburgh, PA, USA.htm; 2005
50. Kanai AJ, Zeidel ML, Lavelle JP. Manganese superoxide dismutase gene therapy protects against irradiation-induced cystitis. *AJP Renal Physiol.* 2000; 283(6):F1304-12.
51. Luo JD, Wang YY, Fu WL, Wu J, Chen AF. Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase Restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. American Heart Association, Inc; 2004.
52. Zhong W, et al. Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth & Differentiation.* 1996;7:1175-86.
53. Hall EJ, Giaccia AJ. Oxygen effect and reoxygenation. In: *Radiobiology for the radiologist.* Sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.p.85-102.
54. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; 56:4509-15.
55. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 1998; 48:149-56.
56. Knocke TH, Weitmann HD, Feklmann HJ, Scizer E, Potter R. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol.* 1999; 53:99-104.

57. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Polon.* 2004; 51(3):563-85.
58. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996; 271:C1172-80.
59. Vordermark D, Broen JM, Phil D. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) as an intrinsic marker of tumor hypoxia in U87 MG human glioblastoma: in vitro and xenograft studies. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.* 2003; 56:1184-93.
60. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev.* 2004; 4:437-47
61. Birner P, Schindl M, Obermain A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:4693-6.
62. Bachtary B, Schindl M, Potter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, Birner P. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 32:117-20.
63. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:2911-6.
64. BioRad Laboratories. Real-time pcr [applications guide].
65. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto SH. Perkiraan besar sample. In: Sastroasmoro S, Ismael S editors. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis.* Jakarta: Sagung Seto, 2002; p. 270.
66. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000; 25:169-93.
67. Granner DK, Well PA. RNA synthesis, processing & modification. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA editors. *Harper illustrated biochemistry.* New York: Lange Medical Books, 2003; p. 351-67.

68. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress-its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001; 3:323-7.
69. 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.
70. 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:R647-55.
71. Landriscina M, et al. The level of MnSOD is directly correlated with grade of brain tumours of neuroepithelial origin. *British Journal of cancer.* 1996; 74:1877-85.
72. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell.* 1991; 64: 313-26.
73. Takada Y, Hachiya M, Park S-H, Osawa Y, Ozawa T, Akashi M. Role of oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: Mechanism for induction of radioresistance. *Mol Cancer Res.* 2002; 1:137-46.
74. Wanandi SI, Dewi S, Paramita R. Peran protein hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) terhadap regulasi gen manganese superoxide dismutase (MnSOD) pada induksi hipoksia sistemik. Oral Presentation. Seminar PBBMI; 15 Agustus 2008; Padang.
75. Evans SM, et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10:8177-84.
76. Schumacker PT. Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 543:57-71.

Lampiran 1. Data Gen Bank

Sekuen MnSOD

LOCUS NM_000636 1593 bp mRNA linear
 PRI 22-OCT-2008
 DEFINITION Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), nuclear
 gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.
 ACCESSION NM_000636
 VERSION NM_000636.2 GI:67782304
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1593
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="6"
 /map="6q25.3"
 gene 1..1593
 /gene="SOD2"
 /gene_synonym="IPO-B"
 /gene_synonym="MNSOD"
 /gene_synonym="Mn-SOD"
 /note="superoxide dismutase 2, mitochondrial"
 /db_xref="GeneID:6648"
 /db_xref="HGNC:11180"
 /db_xref="HPRD:00938"
 /db_xref="MIM:147460"
 ORIGIN
 1 gcgggtgccct tgcgggcgag ctgggggtcgc ggccctgctc ccgcgcgttt cttaaggccc
 61 gcgggcggcg caggagcggc actcgtggct gtggtggctt cggcageggc ttcagcagat
 121 cggcggcatc agcggtagca ccagcactag cagcatgttg agccgggcag tgtcgggcac
 181 cagcaggcag ctggctccgg ttttggggta tctgggctec aggcagaagc acagcctccc
 241 cgacctgcc tacgactacg gcgcctgga acctcacatc aacgcgcaga tcatgcagct
 301 gcaccacagc aagcaccacg cggcctacgt gaacaacctg aacgtcaccg aggagaagta
 361 ccaggaggcg ttggccaagg gagatgttac agcccagata gctcttcagc ctgcactgaa
 421 gttcaatggt ggtggtcata tcaatcatag catcttctgg acaaacctca gccctaaccg
 481 tgggtggaga ccaaagggg agttgctgga agccatcaaa cgtgactttg gttcctttga
 541 caagttaag gagaagctga cggctgcac tgttgggtgc caaggctcag gttggggttg
 601 gcttggtttc aataaggaac ggggacactt acaaattgct gcttgtccaa atcaggatcc
 661 actgcaagga acaacaggcc ttattccact gctggggatt gatgtgtggg agcacgctta
 721 ctaccttcag tataaaaatg tcaggcctga ttatctaaaa gctatttggg atgtaatcaa
 781 ctggggagaat gtaactgaaa gatacatggc ttgcaaaaag taaaccacga tcgttatgct
 841 gagtatgtta agctctttat gactgttttt gtatgtgtat agagtactgc agaatacaqt
 901 aagctgctct attgtagcat ttctgtatgt tgcttagtca cttatttcat aaacaactta
 961 atgttctgaa taatttctta ctaaacattt tgttattggg caagtgattg aaaatagtaa
 1021 atgctttgtg tgattgaatc tgattggaca ttttcttcag agagctaaat tacaattgtc
 1081 atttataaaa ccatcaaaaa tattccatcc atatacttg gggacttgta gggatgcctt
 1141 tctagtccca ttctattgca gttatagaaa atctagtctt ttgccccagt tacttaaaaa
 1201 taaaatatta acactttccc aagggaaaca ctcggcttcc tatagaaaat tgcacttttt
 1261 gtcgagtaat cctctgcagt gatacttctg gtatagtgca cccagtggtt tttgttaggt

Lanjutan

```

1321 caaatgttcc tgtatagttt ttgcaaatag agctgtatac tgtttaaatg tagcagggtga
1381 actgaactgg ggtttgctca cctgcacagt aaaggcaaac ttcaacagca aaactgcaaa
1441 aaggtgggtt ttgcagtagg agaaaggagg atgtttattt gcagggcgcc aagcaaggag
1501 aattgggcag ctcattgctt agacccaatc tccatgatga cctacaagct agagtattta
1561 aaggcagtgg taaatttcag gaaagcagaa gtt

```

Sekuen HIF-1 α

```

LOCUS      NM_001530          4082 bp    mRNA    linear
PRI 12-OCT-2008
DEFINITION Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
(basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A),
transcript variant
1, mRNA.
ACCESSION  NM_001530
VERSION    NM_001530.3  GI:194473733
KEYWORDS   .
SOURCE     Homo sapiens (human)
ORGANISM   Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..4082
            /organism="Homo sapiens"
            /mol_type="mRNA"
            /db_xref="taxon:9606"
            /chromosome="14"
            /map="14q21-q24"
  gene      1..4082
            /gene="HIF1A"
            /gene_synonym="HIF1"
            /gene_synonym="MOP1"
            /gene_synonym="PASD8"
            /gene_synonym="HIF-1alpha"
            /gene_synonym="HIF1-ALPHA"
            /note="hypoxia-inducible factor 1, alpha
subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)"
            /db_xref="GeneID:3091"
            /db_xref="HGNC:4910"
            /db_xref="HPRD:04517"
            /db_xref="MIM:603348"

ORIGIN
1  ggcgcgcgcg gcttggcag ggcagcggc gcgtcccgc ccctctccc ctccccgcg
61  gcccgagcgc gctccgccc ttgcccgcc cctgacgctg cctcagctcc tcagtgcaca
121 gtgctgcctc gtctgagggg acaggaggat caccctctc gtcgcttcgg ccagtgtgtc
181 gggctgggcc ctgacaagcc acctgaggag aggctcggag ccgggcccg accccggcga
241 ttgccgcccg cttctctcta gtctcagag gggtttccc cctcgacccc ccacctctg

```

Lanjutan

301 acttgccctt ccttctcttc tccgcgtgtg gaggagcca gcgcttaggc cggagcgagc
 361 ctgggggccc cccgcgtga agacatcgcg gggaccgatt caccatggag ggcgcccggc
 421 gcgcgaacga caagaaaaag ataagtctctg aacgtcgaaa agaaaagtct cgagatgcag
 481 ccagatctcg gcgaagtaaa gaatctgaag tttttatga gcttgetcat cagttgccac
 541 ttccacataa tgtgagttcg catcttgata aggcctctgt gatgaggctt accatcagct
 601 atttgcgtgt gaggaaactt ctggatcgcg gtgatttggg tattgaagat gacatgaaag
 661 cacagatgaa ttgcttttat ttgaaagcct tggatggttt tgttatggtt ctcacagatg
 721 atggtgacat gatttacatt tctgataatg tgaacaaata catgggatta actcagtttg
 781 aactaactgg acacagtgtg tttgatttta ctcacccatg tgaccatgag gaaatgagag
 841 aaatgcttac acacagaaat ggccttgtga aaaagggtaa agaacaaaac acacagcgaa
 901 gcttttttct cagaatgaag tgtaccctaa ctgaccgagg aagaactatg aacataaagt
 961 ctgcaacatg gaaggtattg cactgcacag gccacattca cgtatatgat accacagta
 1021 accaacctca gtgtgggtat aagaaaccac ctatgacctg cttggtgctg atttgtgaac
 1081 ccatctctca cccatcaaat attgaaattc ctttagatag caagactttc ctcagtcgac
 1141 acagcctgga tatgaaattt tcttattgtg atgaaagaat taccgaattg atgggatatg
 1201 agccagaaga acttttaggc cgctcaattt atgaatatta tcatgctttg gactctgatc
 1261 atctgaccaa aactcatcat gatatgttta ctaaaggaca agtcaccaca ggacagtaca
 1321 ggatgcttgc caaaagaggt ggatatgtct gggttgaaac tcaagcaact gtcatatata
 1381 acaccaagaa ttctcaacca cagtgcattg tatgtgtgaa ttacgttgtg agtggattta
 1441 ttcagcacga cttgattttc tcccttcaac aaacagaatg tgtccttaaa ccggttgaat
 1501 cttcagatat gaaaatgact cagctattca ccaaagtga atcagaagat acaagttagcc
 1561 tctttgacaa acttaagaag gaacctgatg ctttaacttt gctggcccca gccgctggag
 1621 acacaatcat atctttgat tttggcagca acgacacaga aactgatgac cagcaacttg
 1681 aggaagtacc attatataat gatgtaatgc tccctcacc caacgaaaaa ttacagaata
 1741 taaatttggc aatgtctcca ttaccaccg ctgaaacgcc aaagccactt cgaagtatg
 1801 ctgaccctgc actcaatcaa gaagttgcat taaaattaga accaaatoca gagtcaactg
 1861 aactttcttt taccatgccc cagattcagg atcagacacc tagtccttcc gatggaagca
 1921 ctagacaaag ttcacctgag cctaatagtc ccagtgaata ttgtttttat gtggatagtg
 1981 atatggtaaa tgaattcaag ttggaattgg tagaaaaact ttttctgaa gacacagaag
 2041 caaagaaccc attttctact caggacacag atttagactt ggagatgta gctcctata
 2101 tcccaatgga tgatgacttc cagttacgtt ccttcgatca gttgtcaca ttagaagca
 2161 gttccgcaag cctgaaagc gcaagtcctc aaagcacagt tacagatttc cagcagactc
 2221 aaatacaaga acctactgct aatgccacca ctaccactgc caccactgat gaattaaaa
 2281 cagtgacaaa agaccgatg gaagacatta aaatattgat tgcactcca tctctacc
 2341 acatacataa agaaactact agtgccacat catcaccata tagagatact caaagtogga
 2401 cagcctcacc aaacagagca gaaaaggag tcatagaaca gacagaaaaa tctcatccaa
 2461 gaagccctaa cgtgttatct gtcgcttga gtcacaagaa tacagttctt gaggagaac
 2521 taaatccaaa gatactagct ttgcagaatg ctcagagaaa gcgaaaaatg gaactgatg
 2581 gttcactttt tcaagcagta ggaattggaa cattattaca gcagccagac gatcatgcag
 2641 ctactacatc actttcttgg aaacgtgtaa aaggatgcaa atctagttaa cagaatggaa
 2701 tggagcaaaa gacaattatt ttaataacct ctgatttagc atgtagactg ctggggcaat
 2761 caatggatga aagtggatta ccacagctga ccagttatga ttgtgaagtt aatgctccta
 2821 tacaaggcag cagaaacctc ctgcagggtg aagaattact cagagctttg gatcaagta
 2881 actgagcttt ttcttaattt cttctctttt ttggacact ggtggctcat tacctaaagc
 2941 agtctattta tattttctac atctaatttt agaagcctgg ctacaactct gcacaactt
 3001 ggttagttca attttgatcc ctttctact taatttacct taatgctctt ttttagtatg
 3061 ttctttaatg ctggatcaca gacagctcat ttctcagtt ttttggtatt taaaccattg
 3121 cattgcagta gcatcatttt aaaaaatgca cctttttatt tattttttt tggctagggg
 3181 gtttatccct ttttogaatt atttttaaga agatgccaat ataattttt taagaaggca
 3241 gtaacctttc atcatgatca taggcagttg aaaaattttt acacctttt ttccacattt
 3301 tacataaata ataatgcttt gccagcagta cgtggtagcc acaattgac aatattttt
 3361 cttaaaaaat accagcagtt actcatggaa tatatctgca tatatataaa ctagttttta
 3421 agaagaaatt tttttggcc tatgaaattg ttaaacctgg aacatgacat tgttaatcat
 3481 ataataatga ttcttaaatg ctgtatggtt tattatttaa atgggtaag ccatttcat
 3541 aatatagaaa gatatgcata tatctagaag gtatgtggca tttatttggg taaaattctc
 3601 aattcagaga aatcatctga tgtttctata gtcactttgc cagctcaaaa gaaaaaata
 3661 cctatgtag ttgtggaagt ttatgcta atgtgtgtaac tgatattaaa cctaaatggt
 3721 ctgctaccct tgttggata aagatatttt gacgagactg taacaagaa aaaaaaatc
 3781 atgcattctt agcaaaattg cctagtatgt taatttgctc aaaaataaat gtttgattt
 3841 atgcactttg tgcctattaa catccttttt ttcatgtaga ttcaataat tgagtaattt
 3901 tagaagcatt attttaggaa tatatagttg tcacagtaaa tatctgttt ttctatgta
 3961 cattgtacaa attttctatt ccttttctc tttgtggtg gatctaacac taactgtatt
 4021 gttttgttac atcaataaa catcttctgt ggaccaggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

4081 aa

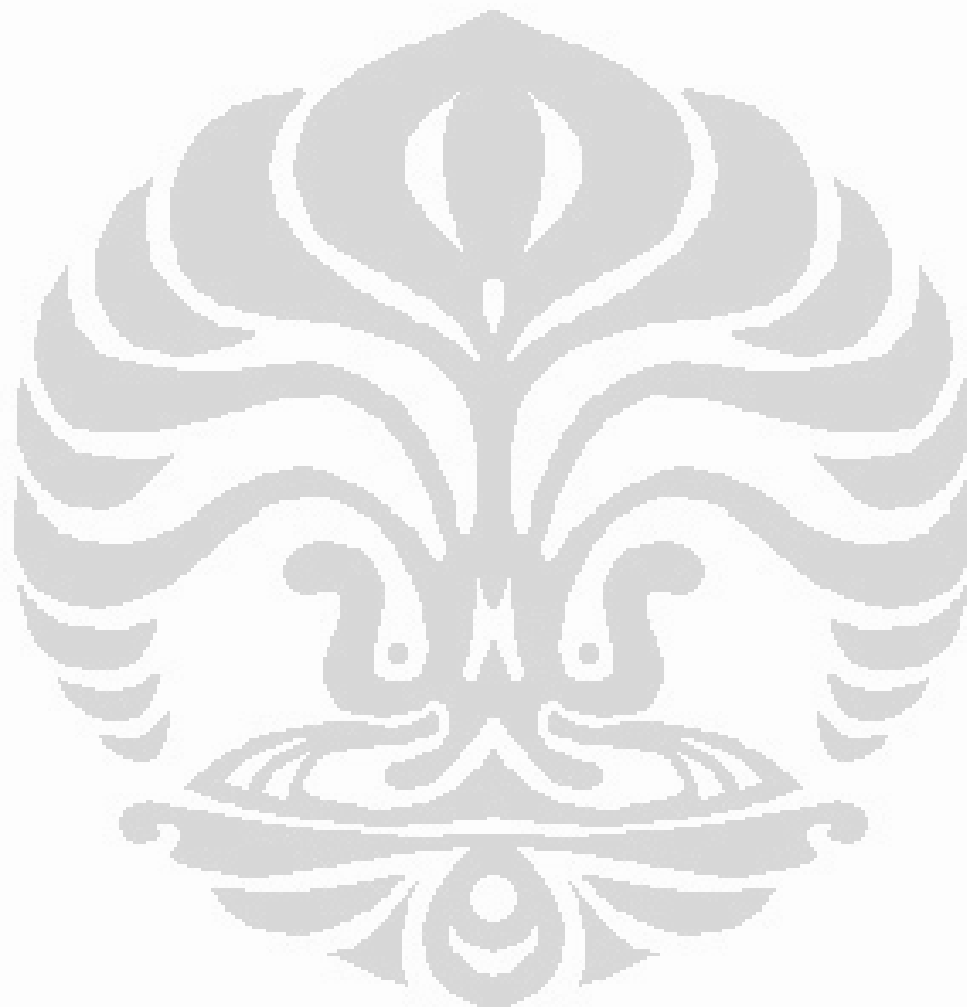
Sekuen 18S rRNA

LOCUS X03205 1869 bp DNA linear
 PRI 16-DEC-1994
 DEFINITION Human 18S ribosomal RNA.
 ACCESSION X03205
 VERSION X03205.1 GI:36162
 KEYWORDS 18S ribosomal RNA; ribosomal RNA.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
 Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1869)
 AUTHORS McCallum, F.S. and Maden, B.E.
 TITLE Human 18 S ribosomal RNA sequence inferred from DNA
 sequence.
 Variations in 18 S sequences and secondary
 modification patterns
 between vertebrates
 JOURNAL Biochem. J. 232 (3), 725-733 (1985)
 PUBMED 4091818
 COMMENT Data kindly reviewed (01-AUG-1986) by Maden B.E.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1869
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9606"
rRNA 1..1869
 /product="18S ribosomal RNA"

ORIGIN
 1 tacctgggtg atcctgccag tagcatatgc ttgtctcaaa gattaagcca tgcattgtcta
 61 agtacgcacg gccggtacag tgaactgcg aatggctcat taaatcagtt atggttcctt
 121 ttgctgctcg ctctctctcc acttgataa ctgtggtaat tctagagcta atacatgccg
 181 acgggcgctg acccctctcg cgggggggat gcgtgcattt atcagatcaa aaccaaccgg
 241 gtcagccctt ctccggcccc gccggggggg cgggcgcggg cggcttttgt gactctagat
 301 aacctggggc cgatcgcacg cccccgtgg cggcgacgac ccattcgaac gtctgcccta
 361 tcaactttcg atggtagtcg cgtgcctac catggtgacc acgggtgacg gggaatcagg
 421 gttcgattcc ggagaggag cctgagaaa ggctaccaca tccaaggaag gcagcaggcg
 481 cgaaattac ccactcccga cccggggagg tagtgacgaa aaataacaat acaggactct
 541 ttogaggccc tgtaattgga atgagtccac tttaaatcct ttaacaggga tccattggag
 601 ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgc
 661 tgcagttaaa aagctcgtag ttgatcttg ggagcggggc ggcggtccgc cgcgaggcga
 721 gccaccgccc gtccccgcc cttgctctc ggcgccccct cgatgctctt agctgagtgt
 781 cccgcggggc ccgaagcgtt tactttgaaa aaattagagt gttcaaagca ggcccagacc
 841 gcctggatac cgcagctagg aataatgga taggaccgcg gttctatttt gttggttttc
 901 ggaactgagg ccatgattaa gagggacggc cgggggcatt cgtattgcgc cgtagaggt
 961 gaaattcttg gaccggcgca agacggacca gagcgaagc atttgccaag aatgttttca
 1021 ttaatcaaga acgaaagtcg gaggttcgaa gacgatcaga taccgtcgta gttccgacca
 1081 taaacgatgc cgaccggcga tgcggcggcg ttattcccat gaccgcccgc gcagcttccg
 1141 ggaaaccaa gtctttgggt tccgggggga gtatggttgc aaagctgaaa cttaaaggaa
 1201 ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcccgtta atttgactca acacgggaaa
 1261 cctcaccggg cccggacacg gacaggattg acagattgat agctctttct cgattccgtg
 1321 ggtggtggtg catggccgtt cttagttggt ggagcgattt gtctggttaa ttccgataac

Lanjutan

```
1381 gaacgagact ctggcatgct aactagttac gcgacccccg agcggtcggc gtccccaac
1441 ttcttagagg gacaagtggc gttcagccac ccgagattga gcaataacag gtctgtgatg
1501 cccttagatg tccggggctg cagcgcgct aactgactg gtcagcgtg tgcctaccct
1561 acgcccgcag gcgcccgtaa cccgttgaac ccattcgtg atggggatcg gggattgaa
1621 ttattcccca tgaacgagga attcccagta agtgcgggtc ataagcttgc gttgattaag
1681 tcctgccct ttgtacacac cgcctgcgc tactaccgat tggatggttt agtgaggccc
1741 tcggatcggc cccgcgggg tcggcccacg gccctggcgg agcgtgaga agacggtcga
1801 acttgactat ctagaggaag taaaagtcgt aacaaggttt ccgtaggatg acctgcggaa
1861 ggatcatta
```



Lampiran 2. Tabel Pengukuran Aktivitas Enzim 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	-	-
Mix substrat	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 pada λ 505 nm 30 detik pertama dan 3 menit kemudian			

Lampiran 3. Data Konsentrasi & Pengenceran RNA

Konsentrasi Template RNA yang digunakan yaitu 640 ng

Kode	Serapan A260 nm		Konsentrasi RNA (ng/ μ l)		Volume RNA RT-PCR (μ l)	
	Sel Glioma	Sel Leukosit	Sel Glioma	Sel Leukosit	Sel Glioma	Sel Leukosit
G1	0,001	0,011	40	440	16	1,5
G2	0,008	0,005	320	200	2	3,2
G3	0,001	0,016	40	640	16	1
G4	0,005	0,004	200	160	3,2	4
G5	0,001	0,015	40	600	16	1,1
G6	0,005	0,009	200	360	3,2	1,8
G7	0,01	0,014	400	560	1,6	1,1
G8	0,009	0,01	360	400	1,8	1,6
G12	0,009	0,011	360	440	1,8	1,5
G13	0,005	0,005	200	200	3,2	3,2
G15	0,007	0,005	280	200	2,3	3,2
G16	0,007	0,017	200	680	2,3	0,9
G17	0,013	0,02	520	800	1,2	0,8
G18	0,008	0,011	320	440	2	1,5
G19	0,011	0,017	440	680	1,5	0,9
G20	0,002	0,005	80	200	8	3,2
G21	0,005	0,011	200	320	3,2	2
G24	0,003	0,009	120	360	5,3	1,7
G25	0,01	0,017	400	440	1,5	1,4
G26	0,022	0,002	880	80	0,7	8

$$\text{Konsentrasi RNA} = \text{A260} \times 40 \text{ ng} \times 1000$$


```

OLIGO      start len   tm   gc% any 3' seq
LEFT PRIMER    1664 20  59.83 50.00 5.00 3.00
tgatgaccagcaacttgagg
RIGHT PRIMER   1820 20  59.83 50.00 4.00 1.00
ttgattgagtgacgggtcag
SEQUENCE SIZE: 4082
INCLUDED REGION SIZE: 4082

```

PRODUCT SIZE: 157, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

```

1561 tctttgacaaacttaagaaggacactgatgctttaactttgctggccccagccgctggag

1621 acacaatcatatcttttagatlttgccagcaacgacacagaaactgatgaccagcaacttg
      >>>>>>>>>>>>>>>>

1681 aggaagtaccattatataatgatgtaatgctcccctcacccaacgaaaaattacagaata
      >>>

1741 taaatttggcaatgtctccattaccaccgctgaaacgcaaagccacttcgaagtagtg

1801 ctgaccctgcactcaatcaagaagttgcattaaaattagaaccaaattccagagtcactgg
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

1861 aactttctttaccatgcccagattcaggatcagacacctagtcttccgatggaagca

```

Gen 18S rRNA

Primer3 Output

WARNING: Numbers in input sequence were deleted.

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Unrecognized base in input sequence

```

OLIGO      start len   tm   gc% any 3' seq
LEFT PRIMER    447  20  59.99 50.00 2.00 0.00
aaacggctaccacatccaag
RIGHT PRIMER   601  20  59.89 50.00 7.00 2.00
cctccaatggatcctcgta
SEQUENCE SIZE: 1871
INCLUDED REGION SIZE: 1871

```

PRODUCT SIZE: 155, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

1 tacctggttgatcctgcccagtagcatatgcttgtctcaaagattaagccatgcatgtcta

Lanjutan



61 agtacgcacggccggtacagtgaaactgcgaatggctcattaaatcagttatggttcctt

121 tggtegcctcgcctcctcccacttggataactgtgtaattctagagctaatacatgccg

181 acgggcgctgaccccccttcgcgggggggatgctgcatttatcagatcaaaaccaaccg

241 gtcagccccctcctccggcccccggccggggggcgggcgccggcggtttggtgactctagat

301 aacctcgggccgatcgacgccccccgtggcggcgacgaccattcgaacgtctgccta

361 tcaactttcgatggtagtcgccgtgcctaccatggtgaccacgggtgacggggaatcagg

421 gttcgattccggagagggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcaggcg
 >>>>>>>>>>>>>>>>>>

481 cgcaaattaccactcccgaacccggggaggtagtgacgaaaaataacaatacaggactct

541 ttcgaggccctgtaattggaatgagtcactttaatcctttaacgaggatccattggag
 <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

601 ggcaagtctggtgccagcagcccggtaatccagctccaatagcgtatattaaagttgc
 <

Lampiran 5. Analisis Primer

Primer MnSOD

Forward *** PRIMER ANALYSIS ***

Sequence: 5'-GCAGTAGCAGCATGTTCAGC-3'
 Length: 20 5' Ext: none
 Composition: A:5 C:5 G:6 T:4
 From molecule: MNSOD.TXT bp pos: 85

Criteria	Criteria Setting	Actual	Meets Criteria
% GC	Min 50, Max 60	55	YES
Tm°C	Min 55, Max 80	70	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches at 3' end	2	YES
No Dimers	Reject >= 7 adj homol bases	4	YES
No Runs	Reject >= 3 base runs	2	YES
No 3' GC runs	Reject >= 3 G or C at 3' end	2	YES

(U) Unique F=FalsePri H=HairPn D=Dimers P=Print ESCape

Reverse *** PRIMER ANALYSIS ***

Sequence: 5'-AGTTCCTCGTTCAGC-3'
 Length: 20 5' Ext: none
 Composition: A:4 C:5 G:6 T:5
 From molecule: MNSOD.TXT bp pos: 87

Criteria	Criteria Setting	Actual	Meets Criteria
% GC	Min 50, Max 60	50	YES
Tm°C	Min 55, Max 80	61	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches at 3' end	2	YES
No Dimers	Reject >= 7 adj homol bases	4	YES
No Runs	Reject >= 3 base runs	-	YES
No 3' GC runs	Reject >= 3 G or C at 3' end	2	YES

(U) Unique F=FalsePri H=HairPn D=Dimers P=Print ESCape

Primer 18s rRNA

Lanjutan

Forward

TABLE 1. PRIMER ANALYSIS (continued)

Sequence: 5'-GAGGGGCTATGATGATGAGGATG-3'					
Length: 20 Tm: 50.0 °C					
GC content: 41.5% GC: 83 AT: 77					
Primer efficiency: 100.0% GC bias: 0.0%					
Criteria	Criteria Rating			Actual	Pass Criteria
N GC	Min	50%	Max	40	YES
Tm	Min	55%	Max	50	YES
No hairpins	Energy cutoff: 0.0 kcal			--	YES
No 3' dimers	Reject	Tm difference at 3' end		2	YES
No dimers	Reject	Tm and total bases		1	YES
No G run	Reject	Tm base pairs		0	NO
No 3' GC runs	Reject	Tm or GC at 3' end		1	YES
GC bias	GC bias	GC bias	GC bias	GC bias	GC bias

Reverse

TABLE 1. PRIMER ANALYSIS (continued)

Sequence: 5'-GAGGGGCTATGATGAGGATG-3'					
Length: 20 Tm: 50.0 °C					
GC content: 41.5% GC: 83 AT: 77					
Primer efficiency: 100.0% GC bias: 0.0%					
Criteria	Criteria Rating			Actual	Pass Criteria
N GC	Min	50%	Max	40	YES
Tm	Min	55%	Max	50	YES
No hairpins	Energy cutoff: 0.0 kcal			--	YES
No 3' dimers	Reject	Tm difference at 3' end		2	YES
No dimers	Reject	Tm and total bases		1	YES
No G run	Reject	Tm base pairs		0	NO
No 3' GC runs	Reject	Tm or GC at 3' end		1	YES
GC bias	GC bias	GC bias	GC bias	GC bias	GC bias

Lanjutan

Primer HIF-1 α

```

LEFT PRIMER      1544  20  59.83  50.00  5.00  3.00  Tgatgaccagcaacttgagg
RIGHT PRIMER     1700  20  59.83  50.00  4.00  1.00  Ttgattgagtgacgggtcag
PRODUCT SIZE: (157) PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

```

* * * PRIMER ANALYSIS * * *

Forward

```

Sequence:      5'-TGATGACCAGCAACTTGAGG-3'
Length: 20      5' Ext: --none--
Composition: A:6 C:4 G:6 T:4
From molecule: HIF1AH*1.TXT      bp pos: 1544

```

Criteria	Criteria Setting	Actual	Meets Criteria
% GC	Min 50. Max 60	50	YES
Tm°C	Min 55. Max 80	69	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	--	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches at 3' end	2	YES
No Dimers	Reject >= 7 adj homol bases	3	YES
No Runs	Reject >= 3 base runs	2	YES
No 3' GC runs	Reject >= 3 G or C at 3' end	2	YES

U=Unique F=FalsePri H=HairPn D=Dimers P=Print ESCape

* * * PRIMER ANALYSIS * * *

Reverse

```

Sequence:      5'-TTGATTGAGTGCAGGGTCAG-3'
Length: 20      5' Ext: --none--
Composition: A:4 C:2 G:6 T:6
From molecule: HIF1AH*1.TXT      bp pos: 1700 (C)

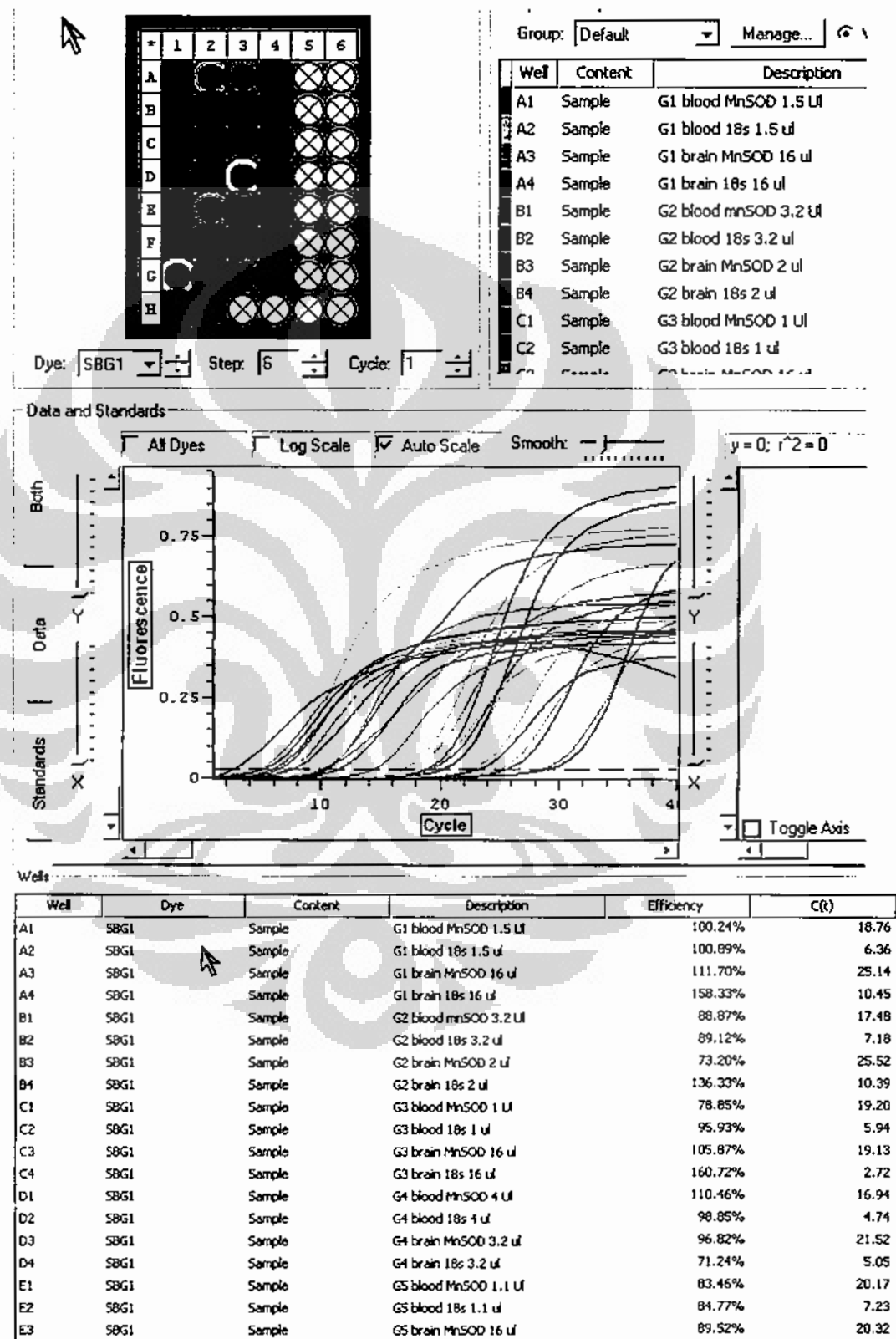
```

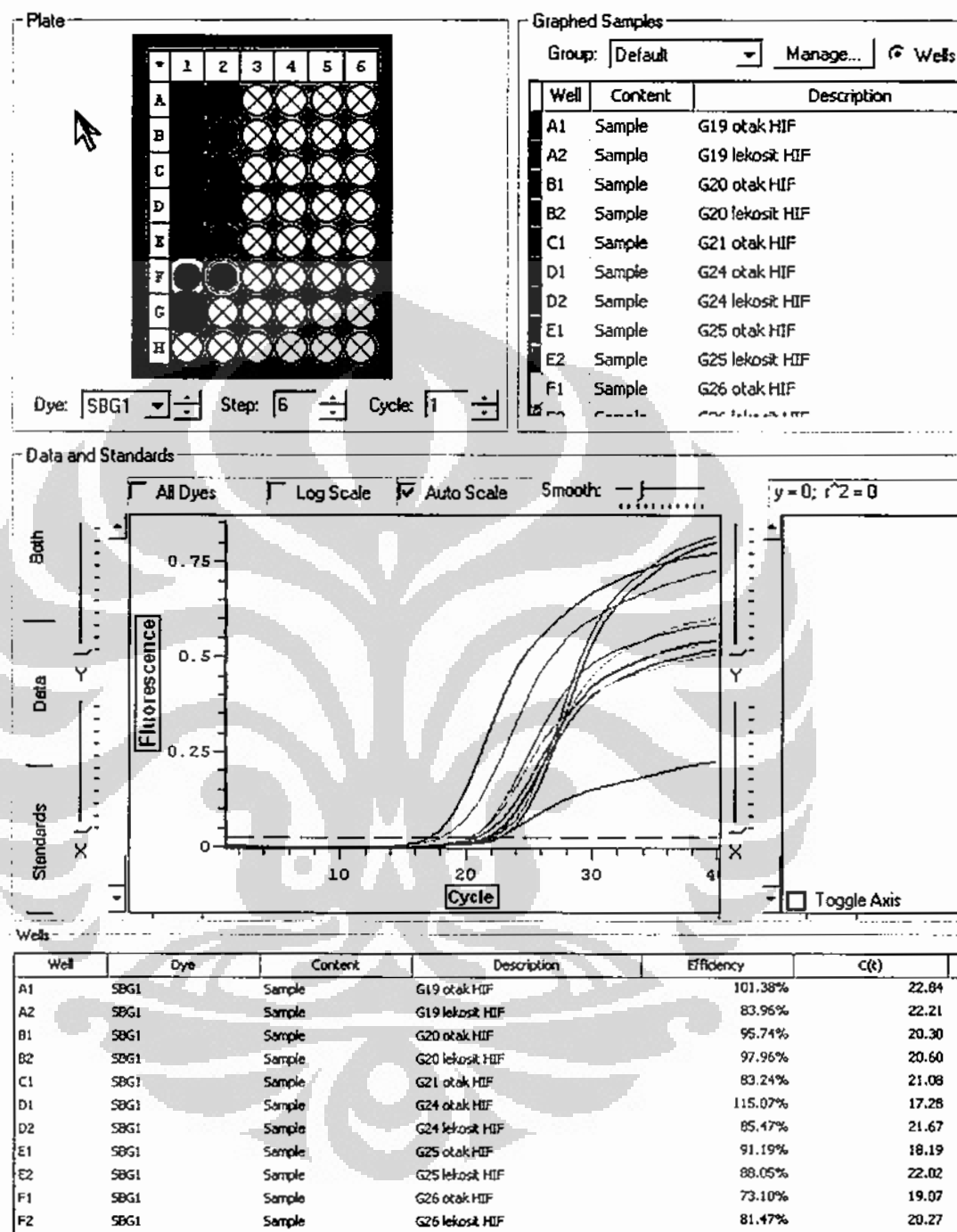
Criteria	Criteria Setting	Actual	Meets Criteria
% GC	Min 50. Max 60	50	YES
Tm°C	Min 55. Max 80	69	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	--	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches at 3' end	1	YES
No Dimers	Reject >= 7 adj homol bases	4	YES
No Runs	Reject >= 3 base runs	3	NO
No 3' GC runs	Reject >= 3 G or C at 3' end	1	YES

U=Unique F=FalsePri H=HairPn D=Dimers P=Print ESCape

Lampiran 6. Nilai C(t) pada Real Time PCR

Gen MnSOD & Gen 18s rRNA



Gen HIF-1 α 

Lampiran 7. Tabel Data Hasil Analisis Real Time PCR Metode Pfaffl

Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	dCt target	Eff.target	dct Ref	eff. Ref	Ratio
SBG1	Sample	G1 blood MnSOD	2	18,76	-6,38	0,00827899			0,3994862
SBG1	Sample	G1 brain MnSOD	2,12	25,14					
SBG1	Sample	G1 blood HIF-1a	1,49	18,77	-2,44	0,18428365			8,8922448
SBG1	Sample	G1 brain HIF-1a	2	21,21					
SBG1	Sample	G1 blood 18s rRNA	2,01	6,36			-4,09	0,0207241	
SBG1	Sample	G1 brain 18s rRNA	2,58	10,45					
SBG1	Sample	G2 blood MnSOD	1,89	17,48	-8,04	0,01219297			0,1919362
SBG1	Sample	G2 brain MnSOD	1,73	25,52					
SBG1	Sample	G2 blood HIF-1a	1,84	21,43	0,29	1,20458803			18,962084
SBG1	Sample	G2 brain HIF-1a	1,9	21,14					
SBG1	Sample	G2 blood 18s rRNA	1,89	7,18			-3,21	0,0635261	
SBG1	Sample	G2 brain 18s rRNA	2,36	10,39					
SBG1	Sample	G3 blood MnSOD	1,79	19,2	0,07	1,05189092			0,0479058
SBG1	Sample	G3 brain MnSOD	2,06	19,13					
SBG1	Sample	G3 blood HIF-1a	1,88	20,32	2,23	4,48467566			0,2042437
SBG1	Sample	G3 brain HIF-1a	1,96	18,09					
SBG1	Sample	G3 blood 18s rRNA	1,96	5,94			3,22	21,957477	
SBG1	Sample	G3 brain 18s rRNA	2,61	2,72					
SBG1	Sample	G4 blood MnSOD	2,1	16,94	-4,58	0,04480688			0,0529144
SBG1	Sample	G4 brain MnSOD	1,97	21,52					
SBG1	Sample	G4 blood HIF-1a	1,83	20,03	1,69	3,36406226			3,9727645
SBG1	Sample	G4 brain HIF-1a	2,05	18,34					
SBG1	Sample	G4 blood 18s rRNA	1,99	4,74			-0,31	0,8467812	
SBG1	Sample	G4 brain 18s rRNA	1,71	5,05					
SBG1	Sample	G5 blood MnSOD	1,83	20,17	-0,15	0,90821142			1,0592047
SBG1	Sample	G5 brain MnSOD	1,9	20,32					
SBG1	Sample	G5 blood HIF-1a	1,83	20,23	-0,41	0,81237338			0,9474332
SBG1	Sample	G5 brain HIF-1a	1,66	20,64					
SBG1	Sample	G5 blood 18s rRNA	1,85	7,23			-0,25	0,8574466	
SBG1	Sample	G5 brain 18s rRNA	1,85	7,48					
SBG1	Sample	G6 blood MnSOD	1,61	25,17	0,14	1,07353234			0,025456
SBG1	Sample	G6 brain MnSOD	1,66	25,03					
SBG1	Sample	G6 blood HIF-1a	1,41	27,56	9,37	796,589667			18,889065
SBG1	Sample	G6 brain HIF-1a	2,04	18,19					
SBG1	Sample	G6 blood 18s rRNA	2,07	13,56			4,54	42,172001	
SBG1	Sample	G6 brain 18s rRNA	2,28	9,02					
SBG1	Sample	G7 blood MnSOD	1,82	25	4,13	10,8201831			0,8705898
SBG1	Sample	G7 brain MnSOD	1,78	20,87					
SBG1	Sample	G7 blood HIF-1a	1,78	25,25	8,42	194,494053			15,648953
SBG1	Sample	G7 brain HIF-1a	1,87	16,83					
SBG1	Sample	G7 blood 18s rRNA	2,01	14,38			4,17	12,428567	
SBG1	Sample	G7 brain 18s rRNA	1,83	10,21					
SBG1	Sample	G8 blood MnSOD	1,77	20,94	0,88	1,63633976			0,3072395
SBG1	Sample	G8 brain MnSOD	1,75	20,06					
SBG1	Sample	G8 blood HIF-1a	1,67	21,27	2,93	9,03990929			1,6973355
SBG1	Sample	G8 brain HIF-1a	2,12	18,34					
SBG1	Sample	G8 blood 18s rRNA	2,32	10,52			3,34	5,3259413	

Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	dCt target	Eff.target	dct Ref	eff. Ref	Ratio
SBG1	Sample	G8 brain 18s rRNA	1,65	7,18					
SBG1	Sample	G12 blood MnSOD	1,91	17,54	-5,14	0,04477147			1,4098101
SBG1	Sample	G12 brain MnSOD	1,83	22,68					
SBG1	Sample	G12 blood HIF-1a	1,93	22,24	0,75	1,71322892			53,947908
SBG1	Sample	G12 brain HIF-1a	2,05	21,49					
SBG1	Sample	G12 blood 18s rRNA	1,97	6,32			-5,05	0,0317571	
SBG1	Sample	G12 brain 18s rRNA	1,98	11,37					
SBG1	Sample	G13 blood MnSOD	1,76	21,04	-14,06	0,00017521			0,033877
SBG1	Sample	G13 brain MnSOD	1,85	35,1					
SBG1	Sample	G13 blood HIF-1a	1,81	22,71	-3,64	0,16156915			31,239032
SBG1	Sample	G13 brain HIF-1a	1,65	26,35					
SBG1	Sample	G13 blood 18s rRNA	2,33	10,56			-8,27	0,005172	
SBG1	Sample	G13 brain 18s rRNA	1,89	18,83					
SBG1	Sample	G15 blood MnSOD	1,74	22,76	1,55	2,29690996			1,002289
SBG1	Sample	G15 brain MnSOD	1,71	21,21					
SBG1	Sample	G15 blood HIF-1a	1,69	22,81	5,3	24,6031535			10,735932
SBG1	Sample	G15 brain HIF-1a	1,83	17,51					
SBG1	Sample	G15 blood 18s rRNA	2,33	10,48			1,09	2,2916644	
SBG1	Sample	G15 brain 18s rRNA	2,14	9,39					
SBG1	Sample	G16 blood MnSOD	1,56	24,07	-4,36	0,115686			6,1954202
SBG1	Sample	G16 brain MnSOD	1,64	28,43					
SBG1	Sample	G16 blood HIF-1a	2,25	19,17	-2,02	0,28548537			15,288814
SBG1	Sample	G16 brain HIF-1a	1,86	21,19					
SBG1	Sample	G16 blood 18s rRNA	2,31	10,49			-5,4	0,0186728	
SBG1	Sample	G16 brain 18s rRNA	2,09	15,89					
SBG1	Sample	G17 blood MnSOD	1,74	22,09	-7,53	0,02903866			0,4079175
SBG1	Sample	G17 brain MnSOD	1,6	29,62					
SBG1	Sample	G17 blood HIF-1a	1,83	21,43	0,34	1,24164377			17,441861
SBG1	Sample	G17 brain HIF-1a	1,89	21,09					
SBG1	Sample	G17 blood 18s rRNA	2,37	10,62			-3,84	0,0711876	
SBG1	Sample	G17 brain 18s rRNA	1,99	14,46					
SBG1	Sample	G18 blood MnSOD	1,65	17,8	-3,81	0,13853887			0,0151966
SBG1	Sample	G18 brain MnSOD	1,68	21,61					
SBG1	Sample	G18 blood HIF-1a	1,57	22,63	0,14	1,0726246			0,1176585
SBG1	Sample	G18 brain HIF-1a	1,65	22,49					
SBG1	Sample	G18 blood 18s rRNA	2,28	9,2			3,76	9,1164262	
SBG1	Sample	G18 brain 18s rRNA	1,8	5,44					
SBG1	Sample	G19 blood MnSOD	1,47	26,56	-5,96	0,05242406			4,8849462
SBG1	Sample	G19 brain MnSOD	1,64	32,52					
SBG1	Sample	G19 blood HIF-1a	1,84	22,21	-0,63	0,64414922			60,022711
SBG1	Sample	G19 brain HIF-1a	2,01	22,84					
SBG1	Sample	G19 blood 18s rRNA	3,23	9,58			-21,08	0,0107318	
SBG1	Sample	G19 brain 18s rRNA	1,24	30,66					
SBG1	Sample	G20 blood MnSOD	1,78	20,89	0,44	1,30146176			0,6272882
SBG1	Sample	G20 brain MnSOD	1,82	20,45					
SBG1	Sample	G20 blood HIF-1a	1,98	20,6	0,3	1,22370524			0,5898106
SBG1	Sample	G20 brain HIF-1a	1,96	20,3					
SBG1	Sample	G20 blood 18s rRNA	2,19	10,08			0,9	2,0747428	

Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	dCt target	Eff.target	dct Ref	eff. Ref	Ratio
SBG1	Sample	G20 brain 18s rRNA	2,25	9,18					
SBG1	Sample	G21 blood MnSOD	1,77	18,57	-5,39	0,076773			0,4047461
SBG1	Sample	G21 brain MnSOD	1,61	23,96					
SBG1	Sample	G21 blood HIF-1a	1,87	21,23	0,15	1,09488288			5,772206
SBG1	Sample	G21 brain HIF-1a	1,83	21,08					
SBG1	Sample	G21 blood 18s rRNA	1,86	7,29			-2,05	0,1896819	
SBG1	Sample	G21 brain 18s rRNA	2,25	9,34					
SBG1	Sample	G24 blood MnSOD	1,81	19,77	-2,62	0,18606538			0,0391195
SBG1	Sample	G24 brain MnSOD	1,9	22,39					
SBG1	Sample	G24 blood HIF-1a	1,85	21,67	4,39	28,8008191			6,0552561
SBG1	Sample	G24 brain HIF-1a	2,15	17,28					
SBG1	Sample	G24 blood 18s rRNA	1,85	7,17			2,3	4,7563337	
SBG1	Sample	G24 brain 18s rRNA	1,97	4,87					
SBG1	Sample	G25 blood MnSOD	1,7	21,34	-3,74	0,14366246			2,0870858
SBG1	Sample	G25 brain MnSOD	1,68	25,08					
SBG1	Sample	G25 blood HIF-1a	1,89	22,1	2,06	3,39482869			49,31907
SBG1	Sample	G25 brain HIF-1a	1,81	20,04					
SBG1	Sample	G25 blood 18s rRNA	1,8	8,76			-4,35	0,068834	
SBG1	Sample	G25 brain 18s rRNA	1,85	13,11					
SBG1	Sample	G26 blood MnSOD	1,72	16,33	-7,41	0,02140219			0,2230417
SBG1	Sample	G26 brain MnSOD	1,68	23,74					
SBG1	Sample	G26 blood HIF-1a	1,81	20,27	1,2	1,93043563			20,117927
SBG1	Sample	G26 brain HIF-1a	1,73	19,07					
SBG1	Sample	G26 blood 18s rRNA	2,05	7,98			-2,99	0,095956	
SBG1	Sample	G26 brain 18s rRNA	2,19	10,97					

Lampiran 8. Data Kasar Pengukuran Aktivitas Spesifik MnSOD

Serapan Standar

Standar	Konsentrasi	Log. Konsentrasi	dA	dA/mnt	% inhibisi
S1			0,132	0,044	
S2	0,208	-0,682	0,098	0,033	25,000
S3	0,625	-0,204	0,066	0,022	50,000
S4	1,25	0,097	0,054	0,018	59,100
S5	2,5	0,398	0,039	0,013	70,460
S6	5	0,699	0,021	0,007	84,090

Serapan Sampel

No.	Kode	Sel Lekosit			Sel Glioma		
		A1	A2	% inhibisi	A1	A2	% inhibisi
1.	G1	0.081	0.173	31.82	0.086	0.096	81.17
2.	G2	0.076	0.163	34.09	0.122	0.188	42.56
3.	G3	0.077	0.178	34.09	0.04	0.059	64.22
4.	G4	0.086	0.169	36.36	0.091	0.115	54.80
5.	G5	0.079	0.176	27.27	0.064	0.082	66.10
6.	G6	0.071	0.17	25	0.091	0.181	9.10
7.	G7	0.071	0.167	27.27	0.165	0.226	46.91
8.	G8	0.08	0.17	31.82	0.149	0.222	36.47
9.	G12	0.08	0.168	34.09	0.132	0.167	63.64
10.	G13	0.085	0.173	34.09	0.14	0.215	24.24
11.	G15	0.087	0.174	34.09	0.052	0.062	81.17
12.	G16	0.085	0.173	34.09	0.115	0.169	45.46
13.	G17	0.143	0.229	15.15	0.087	0.109	58.57
14.	G18	0.06	0.098	28.44	0.043	0.064	60.46
15.	G19	0.064	0.095	41.62	0.086	0.096	81.17
16.	G20	0.086	0.157	34.26	0.085	0.147	42.59
17.	G21	0.088	0.166	28.70	0.079	0.13	52.78
18.	G24	0.142	0.2	61.59	0.271	0.334	51.66
19.	G25	0.166	0.224	61.59	0.155	0.203	58.22
20.	G26	0.162	0.203	72.85	0.104	0.210	29.80

Hasil perhitungan kurva standar SOD semilog didapatkan persamaan garis :

$$Y = 0.0239x - 1.3172 \text{ dengan nilai regresi } (r) = 0.992$$

Untuk menghitung kadar MnSOD dalam Unit/mg protein dilakukan sebagai berikut :

1. Serapan sampel yang diperoleh pada 30 detik pertama dan 3 menit dirata-ratakan \rightarrow diperoleh $\Delta A/\text{menit}$.
2. Dihitung nilai % inhibisi sampel dengan rumus berikut

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ sampel}/\text{mnt} \times 100)}{(\Delta A \text{ S1}/\text{mnt})}$$
3. % inhibisi diplot pada kurva standar

Contoh :

Serapan sampel G1 sel lekosit pada 30 dtk 0.081, pada 3 menit 0.173, maka $\Delta A/\text{mnt} = (0.173 - 0.081)/3 = 0.030$. Kemudian diperoleh % inhibisi = 31.82 %. Nilai % inhibisi yang merupakan nilai X dimasukkan pada persamaan garis di atas :

$$Y = 0.0239x - 1.3172$$

$$Y = 0.0239(31.82) - 1.3172$$

$$Y = -0.557 \text{ (log konsentrasi)}$$

Nilai kadar MnSOD diperoleh melalui kalkulator "antilog" = 0.277

Kadar MnSOD pada kuvet (Y) yaitu 0.277 Unit. Lisat sel lekosit yang diperiksa diencerkan 5 X, sehingga untuk sel lekosit aktivitas MnSOD (nilai Y) dikalikan 5.

Aktivitas MnSOD akan ditentukan berdasarkan mg protein, sehingga nilai aktivitas dalam unit tersebut dibagi dengan kadar protein masing-masing sampel.

Contoh :

Aktivitas MnSOD pada G1 sel lekosit = 1.385 Unit. Kadar protein 2.373 mg/ml, maka aktivitas MnSOD = $1.385 \text{ Unit}/2.373 \text{ mg} = 0.584 \text{ Unit/mg protein}$.

Lampiran 9. Tabel Data Hasil Analisis Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD

Kadar Protein & Aktivitas Spesifik MnSOD pada Sel Leukosit & Sel Glioma

No.	Kode Sampel	Aktivitas MnSOD Sel Leukosit (U/ml)	Kadar Protein Sel Leukosit (mg/ml)	Aktivitas Spesifik MnSOD Sel Leukosit (U/mg protein)	Aktivitas MnSOD Sel Glioma (U/ml)	Kadar Protein Sel Glioma (mg/ml)	Aktivitas Spesifik MnSOD Sel Glioma (U/mg protein)	Kadar Relatif Aktivitas MnSOD Sel Glioma
1.	G1	1,385	2,373	0,584	2,87	12,329	0,233	0,399
2.	G2	1,575	4,329	0,364	1,786	9,84	0,182	0,499
3.	G3	1,575	0,596	2,643	1,416	7,796	0,182	0,069
4.	G4	1,78	2,729	0,652	0,957	22,817	0,042	0,064
5.	G5	1,08	18,83	0,057	1,531	10,729	0,143	2,488
6.	G6	0,955	6,12	0,156	0,286	4,021	0,071	0,456
7.	G7	1,08	9,93	0,109	0,366	6,64	0,055	0,507
8.	G8	1,385	13,39	0,103	1,786	18,817	0,095	0,918
9.	G12	1,575	7,617	0,207	2,576	4,773	0,540	2,610
10.	G13	1,575	8,951	0,176	0,527	7,44	0,071	0,403
11.	G15	1,575	12,427	0,127	2,87	8,329	0,345	2,719
12.	G16	1,575	3,084	0,511	1,239	5,662	0,219	0,428
13.	G17	1,83	7,617	0,240	1,119	14,729	0,076	0,316
14.	G18	1,595	15,262	0,105	1,21	25,969	0,047	0,446
15.	G19	2,76	10,864	0,254	2,87	9,04	0,317	1,250
16.	G20	3,335	3,262	1,022	0,961	10,179	0,094	0,092
17.	G21	2,615	5,128	0,510	1,5	9,395	0,160	0,313
18.	G24	1,837	9,396	0,196	1,168	18,729	0,062	0,319
19.	G25	1,837	6,284	0,292	0,236	12,062	0,020	0,067
20.	G26	3,069	4,862	0,631	0,431	5,929	0,073	0,115

Lampiran 10. Analisis Statistik

1. Uji Kruskal Wallis untuk menganalisis distribusi sampel kadar relatif mRNA MnSOD sel glioma

Kruskal-Wallis Test

mRNA_MnSOD		N	Mean Rank
mRNA	Meningkat	4	18.50
	Tetap	2	15.50
	Menurun	14	7.50
	Total	20	

	mRNA
Chi-Square	12.343
Df	2
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: mRNA_MnSOD

2. Uji Mann Whitney untuk menganalisis distribusi sampel kadar relatif aktivitas spesifik enzim MnSOD sel glioma

Mann-Whitney Test

Rasio_aktivitas		N	Mean Rank	Sum of Ranks
aktivitas_MnSOD	meningkat	4	18.50	74.00
	menurun	16	8.50	136.00
	Total	20		

Lanjutan

Test Statistics^b

	aktivitas_MnSO D
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	136.000
Z	-3.024
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Rasio_aktivitas

3. Uji Korelasi antara kadar relatif mRNA MnSOD dengan aktivitas spesifik MnSOD

Correlations

			Rasio_aktivitas	Rasio_mRNA
Spearman's rho	Rasio_aktivitas	Correlation Coefficient	1.000	.699 ^{**}
		Sig. (2-tailed)	.	.001
		N	20	20
	Rasio_mRNA	Correlation Coefficient	.699 ^{**}	1.000
		Sig. (2-tailed)	.001	.
		N	20	20

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

4. Uji Kruskal Wallis untuk menganalisis distribusi sampel kadar relatif mRNA HIF-1 α sel glioma.

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Rasio_HIF	N	Mean Rank
HIF1	meningkat	16	12.50
	tetap	1	4.00
	menurun	3	2.00
Total		20	

Lanjutan

Test Statistics^{a,b}

	HIF1
Chi-Square	9.229
Df	2
Asymp. Sig.	.010

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Rasio_HIF

5. Uji Kruskal Wallis untuk menganalisis variasi nilai HIF-1 α yang meningkat

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Rasio_HIF	N	Mean Rank
HIF_meningkat	meningkat 1,2-10,1	5	3.00
	meningkat 10,2-20,1	7	9.00
	meningkat > 20,2	4	14.50
	Total	16	

Test Statistics^{a,b}

	HIF_meningkat
Chi-Square	13.103
Df	2
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Rasio_HIF

Lanjutan

6. Uji Tabulasi Silang antara mRNA MnSOD dengan mRNA HIF-1 α **Crosstabs****Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Rasio_mRNA MnSOD* Rasio_HIF	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

Rasio_mRNA MnSOD* Rasio_HIF Crosstabulation

Count		Rasio_HIF			Total
		meningkat	tetap	menurun	
Rasio_mRNA	meningkat	4	0	0	4
MnSOD	tetap	1	1	0	2
	menurun	11	0	3	14
Total		16	1	3	20

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.714 ^a	4	.030
Likelihood Ratio	7.194	4	.126
Linear-by-Linear Association	.866	1	.352
N of Valid Cases	20		

a. 8 cells (88,9%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,10.

Lanjutan

7. Uji Tabulasi Silang antara aktivitas MnSOD dengan mRNA HIF-1 α **Crosstabs**

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Rasio_aktivitas MnSOD * Rasio_HIF	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

Rasio_aktivitas MnSOD * Rasio_HIF Crosstabulation

Count		Rasio_HIF			Total
		meningkat	tetap	menurun	
Rasio_aktivitas MnSOD	meningkat	3	1	0	4
	menurun	13	0	3	16
Total		16	1	3	20

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2- sided)
Pearson Chi-Square	4.766 ^a	2	.092
Likelihood Ratio	4.574	2	.102
Linear-by-Linear Association	.090	1	.764
N of Valid Cases	20		

a. 5 cells (83,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,20.

Lanjutan

8. Uji Korelasi antara kadar relatif mRNA MnSOD yang menurun pada sampel hipoksia glioma

Correlations

			mRNAMnSOD	mRNAHIF
Spearman's rho	mRNAMnSOD	Correlation Coefficient	1.000	-.261
		Sig. (2-tailed)	.	.467
		N	11	10
	mRNAHIF	Correlation Coefficient	-.261	1.000
		Sig. (2-tailed)	.467	.
		N	10	10



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, Fax. : 31930372, e-mail : office@fk.ui.ac.id

No : 235 /PT02.FK/ETIK/2006

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical Research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

"EKSPRESI GEN DAN GENOTIPE MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (MnSOD) PADA SEL GLIOMA MANUSIA: HUBUNGANNYA DENGAN SENSITIVITAS TERAPI RADIASI".

Nama peneliti utama : dr.NOVI SILVI HARDIANYA
Name of the principal investigator

Nama institusi : BIOKIMIA FKUI
Name of institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.



Jakarta, Nopember, 2006..

Ketua
Chairman

Prof.Dr.dr.Agus Firmansyah,SpA(K)

Penjelasan Penelitian Ekspresi Gen dan Genotipe Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) pada Sel Glioma Manusia : Hubungannya dengan Sensitivitas Terapi Radiasi

Tim peneliti di Dept. Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, akan melakukan penelitian untuk mengetahui bagaimana peran MnSOD pada sel tumor otak serta hubungannya dengan keberhasilan terapi radiasi. Glioma adalah tumor otak yang cukup banyak ditemukan di Indonesia. Selama ini, penatalaksanaan pasien glioma dengan terapi pembedahan/operasi pengangkatan tumor, kemudian diikuti dengan terapi sinar/radiasi maupun diikuti dengan kemoterapi (pemberian obat-obat kimia) sering menimbulkan kekambuhan. Oleh karena itu diperlukan terapi tambahan, misalnya dengan terapi gen. Gen adalah suatu materi pembawa genetik/keturunan. MnSOD adalah salah satu antioksidan/antiracun utama yang ada dalam tubuh, yang melindungi tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas/racun. Terdapat variasi gen MnSOD yang berhubungan dengan penyakit saraf, kanker, kencing manis serta penuaan dini. Peningkatan MnSOD ini pada beberapa penelitian dibuktikan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah penyebaran, meningkatkan keberhasilan terapi sinar serta melindungi jaringan normal dari efek terapi sinar. Namun ada penelitian lain, yang menyebutkan bahwa peningkatan MnSOD justru tidak menguntungkan dan dapat menyebabkan sel kanker menjadi tahan terhadap terapi sinar. Oleh karena itu, perlu diketahui bagaimana peran MnSOD pada sel tumor otak manusia baik yang sensitif (peka) maupun yang resisten (tahan) terhadap terapi sinar.

Sebanyak 20 pasien glioma yang akan menjalani operasi pengangkatan tumor, kemudian diikuti dengan terapi sinar tanpa diberikan obat-obat kimia antikanker, akan diikutkan dalam penelitian ini. Bila bersedia, dokter akan mengambil jaringan tumor otak yang diambil saat pasien menjalani operasi yang akan digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Selain itu, dokter juga akan mengambil darah tepi/vena sebanyak 3 cc sebelum pasien menjalani terapi sinar. Darah tersebut juga akan digunakan sebagai sampel penelitian. Pengambilan darah tersebut sedikit menimbulkan rasa sakit dan kadang-kadang menimbulkan bekas biru pada tempat pengambilan darah. Kemungkinan terjadinya perdarahan hebat pada tempat pengambilan darah adalah kecil, namun apabila hal itu terjadi tim peneliti akan mengatasinya dengan cara balut tekan.

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penatalaksanaan pasien tumor otak. Apabila ditemukan peningkatan gen MnSOD pada sel tumor otak yang peka terhadap terapi sinar dan peningkatan tersebut berhubungan dengan keberhasilan terapi sinar, maka dapat dipertimbangkan untuk memberikan terapi gen MnSOD. Namun sebaliknya, apabila ditemukan peningkatan gen MnSOD pada sel tumor otak yang tahan terhadap terapi sinar, maka dapat diberikan penghambat gen tersebut.

Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain menghubungkannya dengan anda.

Bila Bapak/ibu bersedia ikut serta dalam penelitian ini, mohon menandatangani lembar persetujuan. Anda diberi kesempatan untuk menanyakan

semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila membutuhkan penjelasan, anda dapat menghubungi dr. Novi Silvia H di Dept.biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, Telp.(021)3910734, Hp. 08159930181.

BIODATA PESERTA PENELITIAN

Nama :
 Usia :
 Jenis Kelamin :
 Alamat :
 Telp. :

Formulir Persetujuan

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh dokter. Saya mengerti bahwa bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari dr. Novi Silvia H.

Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut dalam penelitian ini.

Tandatangan peserta penelitian : Tanggal :

()

Tandatangan saksi :

()

Lampiran 13. Data Demografi Pasien

Kode Sampel	Jenis Kelamin	Usia	Asal	Hasil Patologi Anatomi
G1	Laki	55 th	RSCM	Astrositoma
G2	Laki	35 th	RSPAU	Oligoastrositoma gr.II
G3	Wanita	27 th	RSCM	mix glioma
G4	Laki	39 th	RSCM	anaplastik astrositoma
G5	Laki	45 th	RSCM	Astrositoma
G6	Laki	60 th	RSKD	Astrositoma fibriler gr.I
G7	Laki	45 th	RSPAD	Ependidoma papiler
G8	Laki	57 th	RSPAD	Astrositoma gr.2
G12	Wanita	31 th	RSKD	mix astrositoma dg anaplastik oligodendroglioma
G13	Laki	42 th	RSPAU	Oligodendroglioma
G15	Laki	23 th	RSCM	GBM
G16	Wanita	36 th	RSPAD	astrositoma
G17	Wanita	34 th	RSCM	astrositoma
G18	Laki	30 th	RSPAU	astrositoma gr.I
G19	Wanita	21 th	RSPAD	Astrositoma gr.III
G20	Laki	20 th	RSPAU	astrositoma gr.I
G21	Wanita	1 th	RSPAD	Astrositoma gr.II
G24	Wanita	30 th	RSPAU	Giant Astrositoma/GBM malignant fibrous meningioma gr2-3
G25	Wanita	27 th	RSPAU	Astrositoma gr II
G26	Laki	34 th	RSPAU	Oligoastrositoma

BIODATA PENULIS

Nama : Novi Silvia Hardiany
 Tempat/Tanggal Lahir : Garut/ 4 November 1979
 Alamat : Perum PERSADA Depok Blok C6/4
 Jl.Raya Tapos Cimanggis Depok
 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 1 Tarogong Garut, tahun 1995-1998
 - SLTPN 1 Garut, tahun 1992-1995
 - SD Persit Tarumanagara Garut, tahun 1986-1992
 Pengalaman Penelitian :
 1. Polimorfisme genetik *manganese superoxide dismutase* (MnSOD) pada populasi normal di Jakarta
 2. Polimorfisme genetik *manganese superoxide dismutase* (MnSOD) pada penderita retinoblastoma
 Sumber Dana Penelitian : RISBIN IPTEKDOK 2007

Penulis

Novi Silvia Hardiany

Gene Expression of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) in Human Glioma Cells

Novi Silvia Hardiany, Septelia Inawati Wanandi, Mohamad Sadikin
Dept. Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

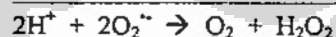
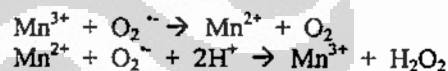
Abstract

Gliomas are primary brain tumors that are aggressive and have poor prognosis despite multi-modality treatment consisting of surgery, radiation and chemotherapy. Therefore, additional therapy, such as gene therapy is needed to improve prognosis. MnSOD is antioxidant enzymes which is suggested as tumor suppressor, but it still controversial. The aim of this study is to analyze MnSOD expression in human glioma cells compared with leucocyte cells as control, so we can explore the role of MnSOD. MnSOD expression was analyzed with measuring mRNA of MnSOD and enzyme activity of MnSOD. MnSOD expression was detected in 20 glioma patients using quantitative Real Time RT-PCR for mRNA MnSOD and biochemistry examination for measuring enzyme activity of MnSOD (RanSOD kit). The results showed that mRNA MnSOD in 70 % sample distribution of glioma cells had 0,015 – 0,627 lower than control, 10 % sample distribution was 1,002-1,059 and 20 % sample distribution had 1,409-6,915 higher than control. Also the enzyme specific activity of MnSOD in 80 % sample distribution of glioma cells showed 0,064-0,506 lower than control and 20 % sample distribution was 1,249-2,718 higher than control. Analysis of statistic for mRNA and enzyme activity of MnSOD using Kruskal Wallis test was significant between groups of distribution sample ($p < .01$).

Keyword: MnSOD, glioma

Glioma is primary brain tumor which is frequently found in Indonesia. High grade gliomas such as glioblastoma multiforme often recur within 6 months of surgery, and despite radiation therapy and chemotherapy, 80 % of patients die within a year. Although ionizing radiation is the most effective treatment modality for malignant gliomas, many of these tumours are resistant to radiation therapy. Therefore, additional therapy, such as gene therapy is needed to improve therapy response.¹

Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) is a mitochondrial enzyme that catalyze the conversion of $O_2^{\cdot -}$ to oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2). MnSOD is the major antioxidant enzyme that scavenge superoxide radical, because electron transport chain in mitochondria is the major reactive oxygen species (ROS) production. MnSOD neutralize anion superoxide by two step dismutase reaction. At this process, Mn^{3+} is reduced and then oxidized.²



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.² For the past 20 years, MnSOD activity has been postulated to be low in malignant tumours. Tumour cells generate superoxide and other ROS, and this generation, if it also occurs in vivo, might effects on tumour cell proliferation and invasion. It has been hypothesised that the production of ROS combined to a decreased antioxidant enzyme level may be characteristic of tumour cells.³

There is a lot of experimental data to suggest that the malignant phenotype of a cancer cell can be suppressed by raising the MnSOD level, and it has been hypothesised that the MnSOD gene is a tumour suppressor. The data on the possible role of MnSOD as a tumour suppressor is based on several studies with cells transfected with the MnSOD gene to increase MnSOD activity.⁴

Overexpression of MnSOD by gene transfection has been shown to suppress radiation-induced neoplastic transformation of mouse embryonic fibroblasts, the metastatic capacity of mouse fibrosarcoma cells and human breast cancer cells, and the growth rate of human melanoma cells, human transformed fibroblasts, rat glioma cells, hamster cheek pouch carcinoma cells, and human prostate carcinoma cells.^{5,6,7,8}

Nevertheless, the role of MnSOD as a tumour suppressor is still controversial, because another study showed that MnSOD expression is high in some of human cancers, include in glioma. The level of MnSOD directly correlates with grade of some tumours and high MnSOD is associated with poor prognosis in some tumours.⁹ In addition, if MnSOD is really anti-apoptotic, as it has been observed, MnSOD overexpression in tumours could offer a survival advantage to a tumour cell and lead to treatment resistance.¹⁰

In this present study, we want to know the expression of MnSOD in human glioma cells compared with leucocyte cells as control, so we can explore the role of MnSOD. MnSOD expression was analyzed with measuring mRNA of MnSOD and enzyme activity of MnSOD.

METHODS

This study was an cross sectional study carried out at Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Medicine University of Indonesia within 12 months (April 2007 – March 2008) using 20 of gliomas patient as subjects. Glioma cells samples were obtained by open surgery craniotomy, samples were stored at -70°C or homogenized directly. Leucocyte cells were obtained from blood venous of patients before radiotherapy treatment. Whole blood were collected in EDTA tube to prevent the blood from clotting. Samples were stored at 2 – 8 °C for not more than 24 hours prior to RNA isolation procedures. Procedures followed were approved by Research and Development Committee, Faculty of Medicine University of Indonesia (No. 235/PT.02.FK/ETIK/2006).

RNA Isolation from glioma tissues and from whole blood using Aquapure RNA Isolation

Kit (BioRad®). The procedures following instruction that kit were:

Cell Lysis

Tissue samples (5-10 mg) were added 300 µl RNA Lysis Solution, homogenized quickly using 5-10 strokes with a microfuge tube pestle. After that, follow the protein-DNA precipitation, RNA Precipitation and RNA hydration Protocol.

300 µl whole blood were added 900 µl RBC Lysis Solution. Tube is inverted to mix and incubated 10 minutes at room temperature. Then, the solution was centrifuged for 20 seconds at 13.000-16.000 x g in a microcentrifuge. Supernatant was removed with a pipet leaving behind the visible white cell pellet and 10 – 20 µl of residual liquid. The tube was vortexed vigorously to resuspended the white blood cells in the residual supernatant. 300 µl RNA Lysis Solution were added to the tube containing the resuspended cells and were pipeted up and down no more than three times to lyse the cells. After that, follow the protein-DNA precipitation, RNA Precipitation and RNA hydration Protocol.

Protein-DNA Precipitation

100 µl Protein-DNA Precipitation Solution were added to the cell lysate. The tube was inverted gently 10 times and placed ino an ice bath for 5 minutes. Tube was centrifuged at 13.000 – 16.000 x g for 3 minutes. The precipitated proteins and DNA will form a tight white pellet.

RNA Precipitation

Supernatant containing the RNA were poured and leaving behind the precipitated protein-DNA pellet into a clean 1.5 microfuge tube containing 300 µl isopropanol. Tube was centrifuge at 13.000 – 16.000 x g for 3 minutes, the RNA will be visible as a small, translucent pellet. Supernatant were poured off and tube was drained briefly on clean absorbent paper. 300 µl 70 & ethanol were added and the tube was inverted several times to wash the RNA pellet. Tube was centrifuge at 13.000 – 16.000 x g for 1 minutes and ethanol were poured off carefully. Tube was inverted and drained on clean absorbent paper and sample was allowed to air dry 10 -15 minutes.

RNA Hydration

50 µl RNA Hydration Solution were added. RNA was allowed to rehydrate for at least 30 minutes on ice. Alternatively, RNA samples was stored at -70°C until use.

Amplification cDNA using Reverse Transcriptase Real Time PCR

RNA samples (both from glioma tissues and whole blood) were amplified using *iScript One Step RT-PCR Kit with SYBR Green* (BioRad). cDNA synthesis and PCR amplification were carried out in the same tube. Reaction protocols were cDNA synthesis for 10 minutes on 50 °C, inactivation of *iScript Reverse transcriptase* for 5 minutes on 95 °C, PCR cycles (40 cycles) for 10 seconds on 95 °C; 30 seconds on 59 °C (after optimalization); 30 seconds on 72 °C, *Melt curv eanalysis* for 1 minutes on 95 °C; 1 minutes on 55 °C; 10 seconds on 55 °C (80 cycles, increase 0,5 °C every cycles). Primer for MnSOD gene were *gcactagcagcatgttgagc* (Forward) and *actctcctcgtgacgctc* (Reverse) with amplicon size were 216 bp. 18S rRNA was used as external standard, amplification procedures same as MnSOD gene. Primer for 18S rRNA were *aaacggctaccacatccaag* (Forward) and *cctccaatggatcctcgta* (Reverse) with amplicon size 155 bp. Primers for this reaction were design by Primer3 programme and Primer Analysis software. Sequence for MnSOD (NM_000636) and for 18S rRNA (X03205) were obtained from NCBI Gene bank. Result of amplification was described MnSOD mRNA expression relative quantitatively using Pfaffi methods.

The MnSOD enzyme specific activity

Tissue samples (10-20 mg) were homogenized in 600 µl *Nuclei Lysis Solution*, Promega® on ice. The mixture was incubated on 65 °C for 10 minutes. The homogenate tissue kept at -20°C before use. Whole blood (200 µl) was added into 600 µl 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 µl of nuclei lysis solution (Promega). Lysates were diluted 5 times with PBS and kept at -20°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:

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

A2 = Absorbance at 3 minutes after incubation with xantin oxidase

A1 = Absorbance at 30 seconds after incubation with xantin oxidase

$$\% \text{ inhibition} = \frac{100 - (\Delta A_{\text{std or samples}}/\text{min} \times 100)}{(\Delta A_{S1}/\text{min})}$$

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 the figure 1. showed melting curve analysis for MnSOD gene (A) and 18S rRNA (B), there is only one peak which is mean that the primer was specific. Electrophoresis results showed the product of amplification, only one band for MnSOD gene (216 bp) and for 18S rRNA (155 bp). That mean the primer was specific. The concept of the threshold cycle (Ct) is at the heart of accurate and reproducible quantification using fluorescence-based RT-PCR. Fluorescent values are recorded during every cycle and represent the amount of product amplified to that point in the amplification reaction. The more template present at the beginning of the reaction, the

fewer number of cycles it takes to reach a point in which the fluorescent signal is first recorded as statistically significant above background. This point is defined as the Ct (figure 2.), and will always occur during the exponential phase of amplification.

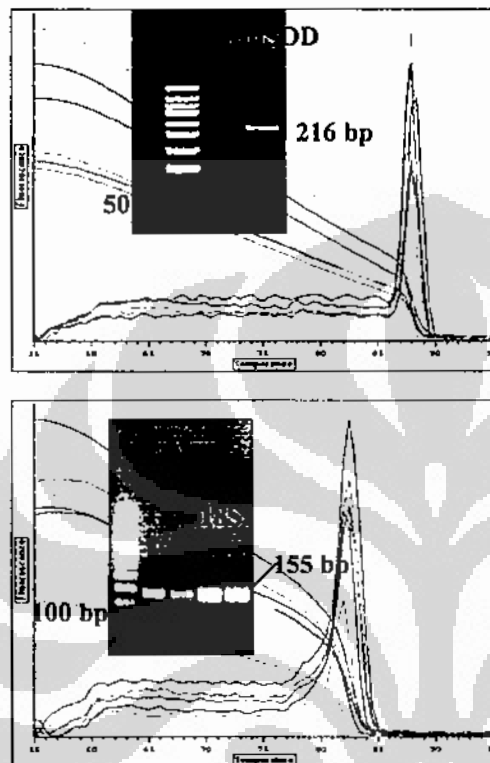


Figure 1. Melting Curve Analysis. Insert: Electrophoresis on 2 % agarose gel for (A) MnSOD gene (216 bp); (B) 18S rRNA gene (155 bp)

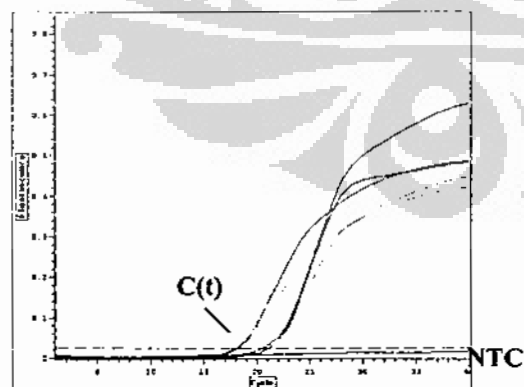


Figure 2. Fluorescent curve in RT-PCR. Ct: Cycle threshold, NTC: Non template Control

The results showed that mRNA MnSOD in 70 % sample distribution of glioma cells had 0,015 – 0,627 lower than control, 10 % sample distribution was 1,002-1,059 and 20 % sample distribution had 1,409-6,915 higher than control. Also the enzyme specific activity of MnSOD in 80 % sample distribution of glioma cells showed 0,064-0,506 lower than control and 20 % sample distribution was 1,249-2,718 higher than control (figure 3). Analysis of statistic for mRNA and enzyme activity of MnSOD using Kruskal Wallis test was significant between groups of distribution sample ($p < .01$). Correlation analysis using Spearman's correlation showed that there were linier relationship between mRNA and specific activity of MnSOD enzyme with moderately relationship and statistically significant ($R 0.699, p < .01$).

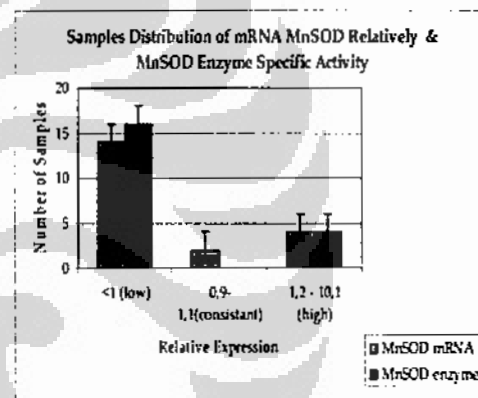


Figure 3. Distribution samples of MnSOD mRNA and MnSOD enzyme specific activity which is significantly different between groups ($p < .01$)

These results indicated that gene expression of MnSOD in human glioma cell are lower than leucocyte cells as a control. This study supported the role of MnSOD as suppressor tumour which is found consistently low in cancer cell.⁴

The lowered mRNA expression of MnSOD was conducted with mutation and polymorphism. The data suggest that genetic polymorphism in the human MnSOD gene may be associated with a risk of developing cancer. Polymorphism of the human MnSOD gene were found in the regions that code for the mature protein and the mitochondria targeting peptide. Two polymorphic variants at codon 16 that lead to incorporation of either alanine or valine in the

mitochondrial targeting sequence are frequently detected in humans. The valine at this position was predicted to change the mitochondrial targeting sequence conformation from the preferred amphiphilic helix to a combination of an amphiphilic helix and a β -pleated sheet, possibly interfering with the transport efficiency of the mature MnSOD protein, potentially decreasing its functional effectiveness. The structural dimorphism in this region is associated with risk for development of breast cancer. The other polymorphism are isoleucine or threonine at amino acid 58 (I58T) in the mature protein. The mature protein containing isoleucine is more stable than the threonine containing protein.¹¹

The low of specific activity MnSOD enzyme in this study was conducted with redox state. The lowered antioxidant capacity and the oxidant-antioxidant imbalance have been considered to play a role in multistage carcinogenesis.³ Tumour cells produce high reactive oxygen species (ROS) and MnSOD as antioxidant have a function to reduce ROS, so the lowered activity of MnSOD in this study was caused by consumption this enzyme. Tumour cells may overproduce ROS because the NADPH-oxidase is regulated by the GTPase RAc1, which is itself downstream of the proto-oncogene Ras.¹²

In this study, there were 20 % of sample distribution which is have higher MnSOD gene expression (both mRNA and activity MnSOD). This caused may be conducted with grade of tumour malignancy and therapy response. Other studies also find the higher MnSOD expression in many human cancers, the level of MnSOD directly correlates with the grade of some tumours, and high MnSOD is associated with poor prognosis in some tumours. The expression of high levels of MnSOD by tumor cells could impair a patient's tumour immunosurveillance capability. Such studies would predict that malignant gliomas constitutively expressing a high level of MnSOD in vivo would be resistant to endogenous TNF α -mediated tumor killing. If this were found to be true in vivo, tumours producing MnSOD may evade the host tumor immunosurveillance mechanisms.¹³ Therefore, the further studie is required to analyze the

correlation this MnSOD expression with grade of tumour malignancy and therapy response.

CONCLUSION

The lowered expression MnSOD in this study can support the role of MnSOD as tumour suppressor, nevertheless further studies is required to proved that role.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by *Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan Teknologi & Kedokteran (RISBIN IPTEKDOK)* 2007. The authors would like to thank to dr. Wawan Mulyawan SpBS (RUSPAU); dr. Renindra Ananda, SpBS (RSCM); dr. Agus Yunianto SpBS (RSPAD) and dr. SyamsuAzhari, SpBS (RSKD) for kindly helping us to collect the sample from glioma patients.

REFERENCES

1. Kanzawa T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Current and future gene therapy for malignant gliomas. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2003; 1:25-34.
2. 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.
3. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J & Hiai H (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*. 358: 1-3.
4. Oberley LW & Oberley TD. Role of antioxidant enzymes in the cancer phenotype. In: Clerch LB & Massaro DJ editors. *Oxygen, gene expression and cellular function (Lung Biology in Health and Disease)*. New York: Marcel Dekker Inc, 1997; p. 279-307.
5. St Clair DK, Wan XS, Oberley TD, Muse KE & St Clair WH. Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by overexpression of mitochondrial superoxide dismutase. *Mol Carcinogen*. 1994; 6:238-242.
6. Safford SE, Oberley TD, Urano M & St. Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 1992; 54:4261-5.
7. Li J-J, Oberley LW, St. Clair DK, Ridnour LA & Oberley TD. Phenotypic