

## Efek Hipoxia Mimetic Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>) terhadap Ekspresi mRNA dan Aktivitas Spesifik Manganese Superoksida Dismutase (Mn SOD) Ginjal Tikus

Yurika Sandra<sup>1</sup>, Ani Retno Prijanti<sup>2</sup>, Septelia Inawati Wanandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta

<sup>2</sup>Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

Korespondensi: E-mail: [yurika.sandra@yarsi.ac.id](mailto:yurika.sandra@yarsi.ac.id)

### Abstract

*MnSOD is a primary antioxidant that protects cells from oxidative stress due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mitochondrial membranes. This study aims to determine the effect of CoCl<sub>2</sub> as hypoxic mimetic agent on mRNA expression of MnSOD and MnSOD-specific activity in rat kidney. Male Sprague dawley rat are induced with 30mg/Kg body weight CoCl<sub>2</sub> intraperitoneally. After that, the experiment was divided into 3 groups: 2, 8, and 24 hours incubation after injection. All groups are compared with control group without injection. All of rat were terminated and the kidneys were removed. mRNA expression and specific activity of the kidney MnSOD are measured. After 2 hours, mRNA expression increased up to 42 times, after 8 and 24 hours return to normal. Specific activity of MnSOD in 2 hours after injection has not changed yet, and after 8 and 24 hours increased 1.5 times. This study shows that induction of Hipoxic mimetic CoCl<sub>2</sub> enhances mRNA expression and MnSOD-specific activity.*

*Keyword: MnSOD, CoCl<sub>2</sub>, mRNA MnSOD, MnSOD-specific activity*

### Pendahuluan

Ginjal adalah organ yang sensitif terhadap penurunan tekanan oksigen (Manotham *et al.*, 2005). Hal ini disebabkan karena dalam kondisi fisiologis, tekanan oksigen di ginjal relatif rendah dibandingkan organ lain. Walaupun aliran darah ke ginjal tinggi (20% dari curah jantung), arteri dan vena yang berjalan paralel memungkinkan difusi oksigen dari arteri ke vena. Faktor ini menyebabkan tekanan oksigen di korteks ginjal hanya 25-50 mmHg dan medula ginjal tidak pernah lebih dari 10-25 mmHg (Adachi *et al.*, 2011; Manotham *et al.*, 2005).

Pada keadaan hipoksia terjadi peningkatan radikal bebas turunan oksigen

(Reactive Oxygen Species=ROS)(Herawati *et al.*, 2017). ROS sebenarnya konstan diproduksi dalam sel sebagai produk berbagai reaksi metabolisme, Stres oksidatif yang disebabkan peningkatan ROS adalah penyebab kerusakan sel yang sangat penting dalam berbagai macam jenis penyakit. Untuk mencegah kelebihan ROS, tubuh memiliki mekanisme pertahanan berupa kompleks antioksidan alami (Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 2009). Salah satunya adalah *Manganese superoxide dismutase* (MnSOD). MnSOD adalah enzim antioksidan primer yang melindungi sel dari stres oksidatif dengan mengkatalisis perubahan superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) menjadi hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan

oksigen (Candas and Li, 2014; Kaewpila et al., 2008; Wanandi et al., 2011; Wang et al., 2005) .

Adaptasi sel terhadap hipoksia telah banyak terungkap pada penelitian-penelitian beberapa tahun terakhir ini. Diketahui bahwa sel akan menginduksi ekspresi gen antara lain eritropoetin (EPO), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), enzim-enzim glikolisis, transporter glukosa (Glut), *inducible NO synthase* (i-NOS) sebagai respon adaptasi. Semenza pada tahun 1999 menemukan bahwa faktor utama yang meregulasi ekspresi gen tersebut adalah *Hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). HIF-1 adalah salah satu faktor transkripsi yang mengendalikan ekspresi gen dalam kondisi hipoksia. HIF-1 merupakan protein heterodimer yang terdiri dari subunit dengan berat molekul 120 kDa dan subunit dengan berat molekul 91-94 kDa. Subunit HIF-1 adalah subunit yang diregulasi oleh kondisi hipoksia. Dalam kondisi normoksia, hidroksilasi asam amino prolin pada protein HIF-1 oleh prolil hidroksilase menyebabkan HIF-1 berikatan dengan protein von Hippel-Lindau (pVHL) yang selanjutnya kompleks ini akan didegradasi di proteosom. Bila oksigen kurang, hidroksilasi prolin akan dihambat dan HIF-1 menjadi stabil (Herawati et al., 2017; Talks et al., 2000; Wanandi et al., 2011).

Kobalt (II) klorida ( $\text{CoCl}_2$ ) merupakan senyawa golongan *hypoxic mimetic agent* karena  $\text{CoCl}_2$  dapat menghambat degradasi dan meningkatkan akumulasi protein HIF-1 melalui hambatan aktivitas prolil hidroksilase. Prolil hidroksilase dalam mengkatalisis reaksi hidroksilasi asam amino prolin pada protein HIF-1, memerlukan kosubstrat oksigen dan oksoglutarat serta kofaktor besi (Fe) dan askorbat. Besi berperan sentral dalam kerja

prolil hidroksilase.  $\text{CoCl}_2$  akan menggantikan Fe dengan Co. Akibatnya prolil hidroksilase tidak dapat bekerja (Wang et al., 2000).

Berdasarkan hal di atas penelitian ini bertujuan mengkaji perubahan ekspresi mRNA dan aktivitas enzim MnSOD pada ginjal tikus yang diinduksi oleh  $\text{CoCl}_2$ .

## Bahan dan Metode Penelitian

### Induksi Tikus dengan $\text{CoCl}_2$

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) jantan galur *Sprague Dawley* yang berusia 8-10 minggu dengan berat antara 140-180 g diperoleh dari Laboratorium Badan Pengawas Obat dan Makanan. Sebelum perlakuan, ke-24 ekor tikus diadaptasikan dengan lingkungan *animal house* selama 1 pekan. Tikus diberi makanan dan minuman *ad libitum*, suhu ruang dijaga pada  $25^\circ\text{C}$  dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam (Herawati et al., 2017).

Serbuk kobalt klorida dilarutkan dengan NaCl fisiologis sehingga didapatkan dosis 30 mg/kgBB/tikus (Wang et al., 2000). Tikus diinjeksi di region abdomen bawah.

Setelah injeksi, tikus dikembalikan ke dalam kandang dan diobservasi. Untuk kelompok 2 jam, tikus dikorbankan setelah 2 jam setelah injeksi. Begitu selanjutnya untuk tikus kelompok 8 jam dan 24 jam.

Tikus dimatikan dengan cara dekapitasi, kemudian dibedah. Organ ginjal kiri dan kanan diambil, ditimbang kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis untuk kemudian disimpan dalam *ultra low temperature freezer*  $-80^\circ\text{C}$

### Isolasi mRNA

Ekstraksi RNA total menggunakan Kit *TriPure Isolation Reagent* (Roche). Jaringan ginjal ditimbang 100 mg, kemudian dimasukkan

ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL *Tripure Isolation Reagent*. Jaringan dilumatkan menggunakan mikropestel steril yang dipasang pada *microhomogenizer*. Setelah homogen, ditambahkan 0,5 mL *Tripure isolation Reagent* dan dihomogenisasi kembali. Setelah itu, homogenat disentrifus dengan kecepatan 12.000 g, suhu 4°C selama 10 menit. Homogenat diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25°C untuk memastikan disosiasi sempurna kompleks nukleoprotein. Pada homogenat ditambahkan 0,2 mL kloroform (CHCl<sub>3</sub>) dan dikocok kuat selama 15 detik, lalu diinkubasi selama 2-15 menit pada suhu 15-25°C. Setelah diinkubasi, homogenat disentrifus dengan kecepatan 12.000 g pada suhu 2-8°C selama 15 menit. Hasilnya terbentuk cairan 3 fase: fase air tidak berwarna di bagian atas mengandung RNA, interfase dan fase organik berwarna merah dibagian bawah mengandung DNA dan protein. Fase air tidak berwarna dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung mikro baru. Interfase dan fase organik disimpan pada suhu 4°C. Ke dalam fase air tidak berwarna ditambahkan 0,5 isopropanol, lalu ditutup dan dibalik-balik 15 kali. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit untuk mempresipitasi RNA. Selanjutnya tabung mikro disentrifus dengan kecepatan 12.000 g pada suhu 2°C selama 10 menit dan kemudian supernatan dibuang. Endapan dicuci dengan 1 mL etanol 75% dengan cara divorteks, kemudian disentrifus dengan kecepatan 7500 g pada suhu 2°C selama 5 menit dan supernatan dibuang. Selanjutnya endapan dibiarkan setengah kering kemudian diresuspensi dalam 50 µL air bebas nuklease yang mengandung DEPC (*DEPC-treated RNase-free water*). Endapan dilarutkan dengan cara memipet beberapa kali kemudian diinkubasi pada suhu

55-60°C selama 15 menit (Wanandi *et al.*, 2011).

### Isolasi Protein

Interfase dan fase organik ditambahkan 0,3 mL etanol absolut, kemudian tabung mikro dibalik-balik beberapa kali. Tabung mikro diinkubasi 2-3 menit, pada suhu 15-25°C untuk mempresipitasi DNA. Sampel disentrifus dengan kecepatan 2000 g, pada suhu 2-8°C selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru, endapan dilanjutkan untuk isolasi DNA. Supernatan yang mengandung fenol, etanol dan protein ditambahkan 1,5 mL isopropanol. Tabung mikro dibalik-balik beberapa kali, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25°C untuk mempresipitasi protein. Sampel disentrifus dengan kecepatan 12.000g, selama 10 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dibuang. Presipitat protein dicuci dengan 2 ml 0,3M guanidin HCl dalam etanol 95% yang telah ditambahkan 2 mM *phenyl methyl sulfonyl fluoride* (PMSF). Campur sampel dengan baik, kemudian inkubasi pada suhu 15-25°C selama 20 menit. Sentrifus sampel dengan kecepatan 7500g selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dibuang. Pencucian presipitat protein dilakukan 3 kali. Setelah pencucian, ke dalam isolat protein ditambahkan 2 mL etanol 100%. Sampel divorteks, kemudian diinkubasi selama 20 menit, pada suhu 15-25°C. Sampel disentrifus dengan kecepatan 7500 g, selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dibuang, sisa etanol dibiarkan menguap (*air-drying*). Pelet protein ditambahkan SDS 1% dan dipipet beberapa kali. Pelet diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit untuk melarutkan pelet. Sampel disentrifus dengan kecepatan 10.000 g, selama 10 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dituang ke tabung mikro yang baru. Sebelum digunakan

sampel dapat disimpan pada suhu  $-15$  s/d  $-25^{\circ}$  C. Sampel ini digunakan untuk pengukuran aktivitas MnSOD(Wanandi *et al.*, 2011).

### Pengukuran ekspresi mRNA MnSOD dengan Real time PCR

Primer MnSOD didesain menggunakan program *Primer3* dan *Primer Analysis*. Data *gene bank* untuk MnSOD: NM\_017051. Primer MnSOD yang digunakan yaitu 5'-AAC GTC ACC GAG GAG AAG TA-3' untuk forward dan 5'-TGA TAG CCT CCA GC A ACT CT-3' reverse dengan produk PCR sebesar 178 bp. Primer beta aktin untuk gen referensi MnSOD yang digunakan yaitu 5'-CAC TGG CAT TGT GAT GGA CT-3' untuk forward dan 5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3' untuk reverse dengan produk PCR sebesar 174 bp. Amplifikasi cDNA dilakukan dengan alat *real time PCR* (MiniOpticon, BioRad) menggunakan *iScript One-step RT-PCR with SYBR Green* (BioRad). Analisis ekspresi gen dinilai secara *relative quantification* menggunakan metode livak.

### Pengukuran aktivitas spesifik MnSOD

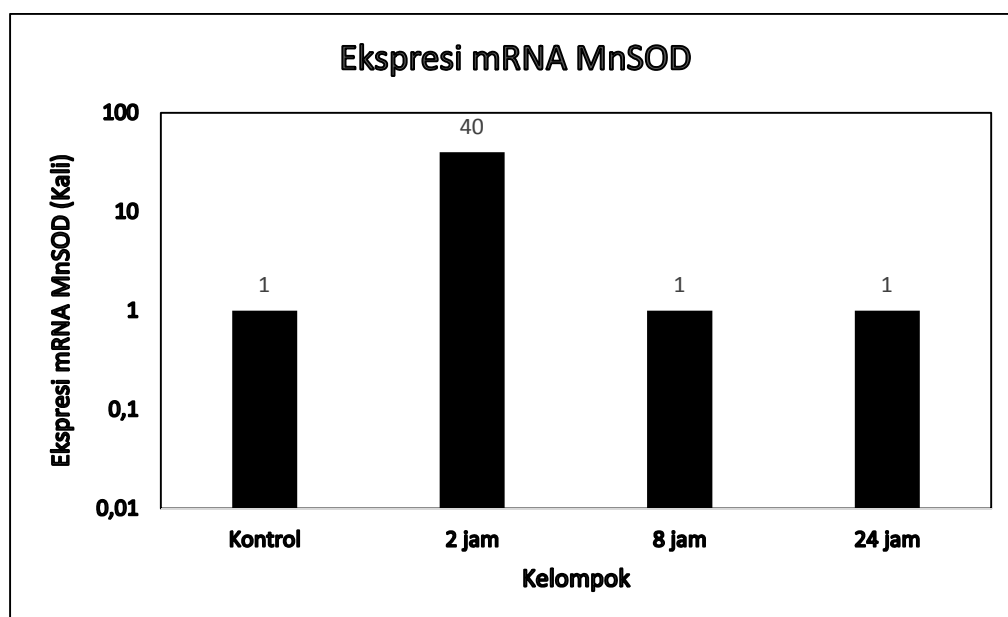
Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia menggunakan kit RanSOD<sup>®</sup>. Pereaksi-pereaksi pada kit ini terdiri dari *mixed substrat* yang mengandung xantin, buffer fosfat untuk mengencerkan (standar maupun sampel), xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar.

### Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik *SPSS (Statistical Product and Service Solution/PASW(Predictive Analytic Software))*. Semua data hasil pengukuran dilakukan uji normalisasi menurut distribusi Gaussian dengan pendekatan uji Kolmogorov-Smirnov. Bila distribusi data normal digunakan uji kemaknaan *student t-tes* dan bila data tidak terdistribusi normal digunakan uji Mann Whitney rank.

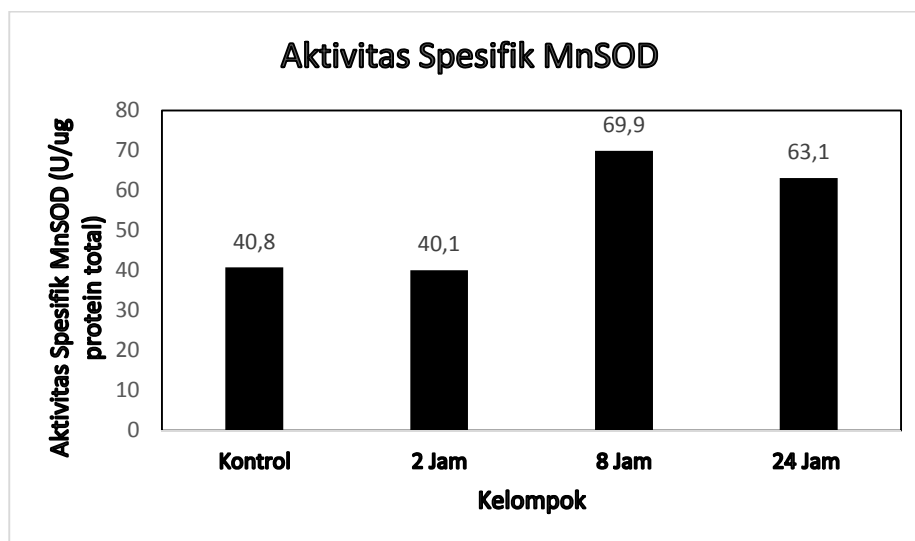
### Hasil Penelitian

#### Analisis Ekspresi mRNA MnSOD



Gambar 1. Tingkat Ekspresi mRNA Relatif MnSOD pada Ginjal. Kadar mRNA Relatif pada Kelompok Inkubasi 2, 8 dan 24 Jam Dinormalisasi dengan Kadar mRNA Kelompok Kontrol.

### Analisis Aktivitas Spesifik MnSOD



Gambar 2. Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD pada Ginjal Tikus yang diinduksi  $\text{CoCl}_2$  Intraperitoneal dengan Masa Inkubasi 2, 8 dan 24 Jam.

Gambar 1 menunjukkan hasil pemeriksaan tingkat ekspresi mRNA relatif MnSOD dengan menggunakan *real time* PCR. Terlihat bahwa ekspresi relatif mRNA MnSOD segera ditingkatkan pada 2 jam setelah injeksi  $\text{CoCl}_2$  40 kali dibandingkan dengan kontrol. Pada 8 jam dan 24 jam setelah injeksi, terjadi penurunan mRNA MnSOD sampai normal.

Gambar 2 memperlihatkan hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim MnSOD. Prinsip pemeriksaan ini dengan mengukur besarnya inhibisi pembentukan radikal superoksida oleh MnSOD. Terlihat bahwa aktivitas spesifik MnSOD meningkat pada 8 jam setelah injeksi  $\text{CoCl}_2$  dan cenderung menurun kembali setelah 24 jam walaupun belum sama dengan kontrol. Terlihat perbedaan yang bermakna antara aktivitas spesifik MnSOD pada kelompok 8 jam dan 24 jam dibandingkan kontrol ( $p < 0,01$ )

### Diskusi

MnSOD adalah salah satu enzim antioksidan primer yang terdapat di matriks

mitokondria sel (Kaewpila *et al.*, 2008; Wanandi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005). Ketika ROS meningkat, kebutuhan akan MnSOD akan meningkat. Sel merespon dengan meningkatkan sintesis mRNA MnSOD. Dalam 2 jam pertama, sel ginjal memperlihatkan peningkatan ekspresi mRNA yang tinggi, sedangkan aktivitas MnSOD belum meningkat. Hal ini disebabkan injeksi  $\text{CoCl}_2$  dengan dosis yang tinggi menyebabkan produksi ROS meningkat. Pada saat 8 jam setelah injeksi  $\text{CoCl}_2$  ekspresi mRNA MnSOD menurun sampai dibawah normal. Hal ini diduga disebabkan karena pada saat ini kebutuhan akan protein MnSOD telah terpenuhi, dibuktikan dengan peningkatan aktivitas MnSOD pada 8 jam setelah injeksi  $\text{CoCl}_2$ . Setelah 24 jam injeksi  $\text{CoCl}_2$ , ekspresi mRNA MnSOD dan aktivitas MnSOD mulai mendekati normal. Hal ini menunjukkan induksi Hipoxia mimitic  $\text{CoCl}_2$  bersifat sementara.

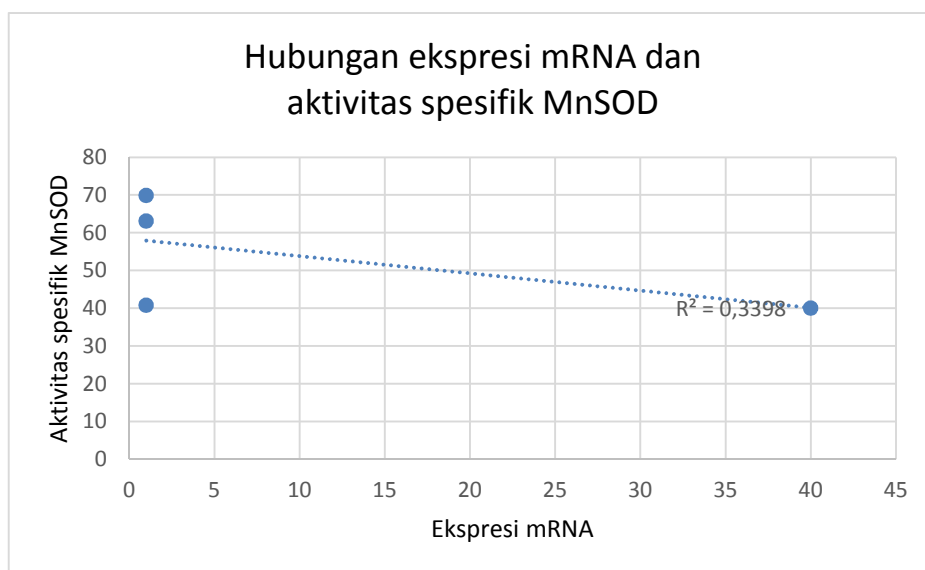
Penelitian yang dilakukan Wanandi *et al.* menunjukkan ekspresi relatif mRNA MnSOD

pada darah dan jantung tikus menurun selama fase awal induksi hipoksia sistemik (hari ke 1) dan meningkat setelah hari ke 7, sedangkan ekspresi mRNA pada otak meningkat sejak hari ke 1 dan mencapai kadar maksimum pada hari ke 7. Hasil pengukuran aktivitas spesifik MnSOD selama awal induksi hipoksia sistemik menyerupai hasil ekspresi mRNA. Pada kondisi hipoksia yang sangat lanjut (hari ke 21), aktivitas spesifik MnSOD pada darah, jantung dan otak menurun secara signifikan. Ekspresi mRNA MnSOD pada ketiga jaringan tersebut selama hari ke 0-14 induksi hipoksia sistemik berkorelasi positif dengan aktivitas spesifiknya. Selain itu, ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada jantung berkorelasi kuat dengan hasil pada darah. Hal ini menunjukkan pola adaptasi organ terhadap hipoksia sistemik dan hipoksia mimetik berbeda.

Penelitian yang dilakukan oleh Wang *et.al.* (2000) dengan induksi  $CoCl_2$  terhadap sel neuron PC12 dari tikus menunjukkan adanya kerusakan mtDNA sel tanpa merusak DNA

nuklear(Wang *et al.*, 2000). Dapat disimpulkan disini, akumulasi ROS karena induksi hipoksia oleh  $CoCl_2$  terjadi di mitokhondria. Hal ini menyebabkan Ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD sebagai antioksidan primer di membran mitokondria akan meningkat.

Hubungan ekspresi mRNA MnSOD dan aktivitas spesifik MnSOD berkorelasi negatif ( $R^2 = 0,34$ ). Hal ini menunjukkan bahwa ketika aktivitas MnSOD menurun, mRNA akan disintesis lebih banyak, begitupun sebaliknya. Penelitian yang dilakukan McAtee *et.al* (2010) memperlihatkan hasil yang sama tentang hubungan ekspresi mRNA dan protein MnSOD. Penelitian yang dilakukan pada cell line kanker payudara menunjukkan korelasi yang negatif dengan nilai  $R^2=0,4$ . Hal ini disebabkan proses modifikasi pasca translasi yang menyebabkan ekspresi mRNA lebih dulu terdeteksi daripada protein dan aktivitas MnSOD (McAtee and Yager, 2010). Hubungan ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hubungan Ekspresi mRNA-MnSOD dengan Aktivitas Spesifik MnSOD

### Simpulan

CoCl<sub>2</sub> sebagai agen *hipoxia mimetic* dapat meningkatkan ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD pada ginjal tikus.

### Ucapan Terimakasih

Terimakasih kami ucapkan kepada DRPM UI yang telah mendanai penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Adachi T, Aida K, Nishihara H, Kamiya T, Hara H, 2011. Effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of extracellular-superoxide dismutase in retinal pericytes. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1297–1300.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee R.K, 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* 77, 9.
- Candas D, Li JJ, 2014. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1599–1617. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5305>
- Herawati M, Wardaya, Mulyawan W, Farhan, FS, Ferdinal F, Jusman SWA, Sadikin M, 2017. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 and Myoglobin in Rat Heart as Adaptive Response to Intermittent Hypobaric Hypoxia Exposure. *HAYATI J. Biosci.* 24, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.08.010>
- Kaewpila S, Venkataraman S, Buettner GR, Oberley LW. 2008. Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1 alpha induction via superoxide. *Cancer Res.* 68, 2781–2788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2635>
- Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M. 2005. A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int.* 67, 1428–1439. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00220.x>
- McAtee BL, Yager JD. 2010. Manganese superoxide dismutase: Effect of the ala16val polymorphism on protein, activity, and mRNA levels in human breast cancer cell lines and stably transfected mouse embryonic fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 335, 107–118. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0247-6>
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 157, 411–421.
- Wanandi SI, Dewi S, Jusman S.W.A, Sadikin M. 2011. Expression of manganese superoxide dismutase in rat blood, heart and brain during induced systemic hypoxia. *Med. J. Indones.* 20, 27–33. <https://doi.org/10.13181/mji.v20i1.421>
- Wang G, Hazra T.K, Mitra S, Lee H.-M, Englander E.W. 2000. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* 28, 2135–2140.
- Wang M, Kirk J.S, Venkataraman S, Domann F.E, Zhang H.J, Schafer F.Q, Flanagan S.W, Weydert C.J, Spitz D.R, Buettner G.R, Oberley L.W. 2005. Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-

- 1alpha and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 24, 8154–8166. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208986>
- Webb J.D, Coleman M.L, Pugh C.W. 2009. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 3539–3554. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0147-7>