



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

### *The Pattern of Hypoxia Inducible Factor-1a (HIF-1a) mRNA and the Expression of HIF-1a Protein of Kidney on Chronic Systemic Hypoxia*

Yulia Suciati<sup>1</sup>, Ani Retno Prijanti<sup>2</sup>, Mohamad Sadikin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, YARSI UNIVERSITY, Jakarta

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine University of Indonesia

**KATA KUNCI** Hipoksia; ekspresi gen HIF-1a; Western Blott  
**KEYWORDS** Hypoxia; HIF-1a gene expression; Western Blott

**ABSTRAK** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana pola mRNA HIF-1a dan ekspresi protein HIF-1a pada organ ginjal dari tikus yang mengalami kondisi hipoksia secara sistemik menggunakan Hypoxic Chamber dengan kadar O<sub>2</sub> 8% dan Nitrogen 92% dan kelompok kontrol pada kondisi normoksia. Pola mRNA HIF-1a dilihat berdasarkan hasil RT-PCR dengan membandingkan rasio kelompok normoksia dan kelompok hipoksia yang menunjukkan terdapat peningkatan ekspresi mRNA HIF-1a sejalan dengan lamanya hipoksia yang mencapai puncak pada kelompok hipoksia 3 hari dan mulai mengalami penurunan pada kelompok 7 hari. Ekspresi protein HIF-1a dilakukan dengan metode Western Blott yang memperlihatkan terdapatnya peningkatan ekspresi protein HIF-1a yang mulai mengalami penurunan pada kelompok hipoksia 14 hari.

**ABSTRACT** The aim of this study was to examine the pattern of Hypoxia Inducible Factor-1a (HIF-1a) mRNA and HIF-1a protein expression in rat kidney in systemic chronic hypoxia using hypoxic chamber with 8% Oxygen and 92% Nitrogen and control group with normoxia condition. The pattern was observed based on RT-PCR result comparing the ratio of control group and the hypoxic group. Six groups of 8 male mice Sprague and Dawley each group were used in this experiment. The result showed that HIF-1a mRNA expression elevated gradually and reached the peak at 3 days in hypoxia group and started to decrease in 7 day hypoxia group. The HIF-1a protein expression was measured employing Western Blott method that showed an increase expression until 14 days of hypoxia which eventually started to decrease.

Oksigen memegang peranan penting dalam kehidupan terutama pada organisme aerob yang menggunakan oksigen dan berperan sebagai akseptor elektron terakhir pada

*Correspondence:*

Dr. Yulia Suciati, M.Biomed., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Tel. 021-4206674-76, Facksimile: 021-4244574

rantai pernafasan dalam rangka memperoleh energi maksimal (Bruick, 2003). Sel memiliki respon terhadap perubahan ketersediaan oksigen yang berdampak pada banyak aspek homeostasis baik secara fisiologis maupun patologis (Nangaku *et al.*, 2008). Selama lebih dari satu dekade terakhir, pemahaman mengenai mekanisme adaptasi terhadap hipoksia pada tingkat molekuler telah jauh berkembang. Sebagai respon terhadap hipoksia, terdapat perubahan ekspresi banyak gen yang ternyata diperantarai oleh suatu faktor transkripsi yang dinamakan *Hypoxia Inducible Transcription Factor (HIF)* (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008; Huang and Bunn, 2003; Kojima *et al.*, 2007).

HIF diaktivasi secara fisiologis oleh hipoksia (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008; Huang and Bunn, 2003; Kojima *et al.*, 2007). Kedua mRNA subunit HIF ( $\alpha$  dan  $\beta$ ) dan proteinnya selalu diekspresi, namun subunit HIF 1 $\alpha$  secara cepat langsung didegradasi pada kondisi normoksia (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008). Hal ini menyatakan bahwa jumlah HIF 1 $\alpha$  diregulasi oleh proses degradasi. Dalam keadaan normoksia, proses degradasi diperankan oleh *Oxygen Dependent Degradation Domain (ODD)* yang akan dikenali oleh suatu protein supresor tumor, Von Hippel Lindau (pVHL) (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008; Huang and Bunn, 2003; Kojima *et al.*, 2007; Corn, 2007). Interaksi antara HIF 1 $\alpha$  dan pVHL dipicu oleh adanya hidrosilasi pasca translasi pada residu prolin yang terdapat di ODD HIF 1 $\alpha$  yang dikatalisis oleh HIF-Prolyl Hidrosilase (Nangaku *et al.*, 2008; Huang and Bunn, 2003). Protein yang terhidrosilasi ini dikenali oleh pVHL, yang berfungsi sebagai komponen kompleks multi-subunit ubiquitin ligase. Hal ini mempromosi protein HIF 1 $\alpha$  untuk didegradasi oleh proteasome (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008). pVHL akan gagal mengenali HIF 1 $\alpha$  dalam kondisi hipoksia, yang akan menyebabkan peningkatan protein

HIF 1 $\alpha$  (Bruick, 2003). HIF 1 $\alpha$  akan bertranslokasi ke inti dan berdimerisasi dengan subunit HIF 1 $\beta$  membentuk faktor transkripsi yang akan berikatan dengan *Hypoxia Response Elements (HREs)* pada promoter dan mengaktivasi lebih dari 60 gen target (Bruick, 2003; Nangaku *et al.*, 2008; Huang and Bunn, 2003; Corn, 2007).

HIF ternyata juga mempunyai peran penting dalam regulasi proses biologis baik pada kondisi fisiologis maupun patologis ginjal. Ginjal adalah organ yang sangat sensitif terhadap perubahan pasokan oksigen. Sensitivitas ini memiliki keuntungan salah satunya dengan cara memfasilitasi ginjal untuk memproduksi eritropoetin dalam mekanisme adaptasinya. Regulasi produksi eritropoetin diinduksi oleh HIF 1 $\alpha$ . Namun, tingginya sensitivitas terhadap tekanan oksigen ini juga dapat mengakibatkan kecenderungan ginjal terhadap terjadinya kerusakan sel yang disebabkan hipoksia (*hypoxic injury*).

Ginjal adalah organ yang menunjukkan karakteristik yang unik antara pasokan darah dan oksigenasinya. Meskipun aliran darah ginjal dan pasokan oksigen tinggi, namun tekanan oksigen di ginjal relatif rendah terutama pada medulla ginjal. Hal ini disebabkan adanya struktur susunan antara arteriol afferent dan efferent yang paralel, yang memungkinkan oksigen dapat melewati arteriol menuju venula post glomerulus secara difusi. Adanya *countercurrent* yang tertutup pada peritubular ini yang memungkinkan dipertahankannya kondisi hipoksia secara fisiologis (10-15 mmHg) (Nangaku *et al.*, 2008). Sel-sel segmen tubulus proksimalis dan tubulus distal asendens sangatlah peka terhadap ketiadaan oksigen. Terbatasnya pasok oksigen pada jaringan ginjal menyebabkan ginjal peka terhadap hipoksia dan telah lama diketahui pula bahwa hipoksia memegang peran penting dalam patogenesis dan progresivitas gagal ginjal akut dan

kronis. Pada kedua kondisi ini, hipoksia tidak hanya menyebabkan penurunan energi dan aktivasi metabolisme alternatif, namun juga menginduksi mekanisme regulasi melalui ekspresi gen tertentu.

Secara khusus, HIF berperan dalam regulasi angiogenesis, metabolisme energi, apoptosis dan metabolisme besi, regulasi pH dan regulasi vasomotor. Hipoksia memegang peranan penting dalam perkembangan kerusakan ginjal akut, nefropati radiokontras, dan glomerulonefritis akut. Banyak data menunjukkan hipoksia kronik adalah jalur utama dari stadium akhir gagal ginjal kronik (Nangaku and Eckardt, 2007).

Melihat bahwa hipoksia pada ginjal mempunyai peran penting dalam perkembangan dan progresivitas gagal ginjal baik akut maupun kronis, maka aktivasi HIF dapat menjadi sasaran utama terapi dalam pendekatan terapi di masa depan. Pendekatan ini dapat dipertimbangkan untuk gagal ginjal, dimana aktivasi HIF dapat menimbulkan ekspresi berbagai macam gen yang terkait dengan mekanisme adaptasi terhadap kondisi hipoksia pada ginjal (Nangaku *et al.*, 2008; Nangaku and Eckardt, 2007).

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respon ginjal pada tingkat molekul dalam keadaan hipoksia sistemik kronis. Secara khusus, penelitian ini menguji perubahan ekspresi HIF 1 $\alpha$  pada tingkat mRNA dan mempelajari perubahan translasi HIF 1 $\alpha$  pada tingkat protein.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo*. Penelitian ini menggunakan tikus Sprague Dawley jantan yang sehat, umur 10-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, yang diperoleh dari Laboratorium LKM Depkes RI Jakarta.

Hewan coba pada percobaan ini diinduksi hipoksia dan kontrol normoksia yang dibagi menjadi enam kelompok (masing-masing 8 ekor tikus). Kelompok pertama adalah kelompok kontrol atau tanpa perlakuan dan lima kelompok lainnya adalah kelompok perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia 1, 3, 5, 7, dan 14 hari. Gas campuran khusus dalam tangki gas yang digunakan mengandung oksigen 8% dan nitrogen 92% dengan sungkup hipoksia (*Plexyglass Hypoxic Chamber*).

## Isolasi DNA, RNA dan protein ginjal tikus

Sebanyak 50-100 mg jaringan ginjal dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu ditambah 1 mL TriPure Isolation Reagent dan dihomogenisasi. Setelah itu homogenat diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25 °C. Setelah diinkubasi pada homogenat ditambahkan 0,2 ml CHCl<sub>3</sub> dan dikocok kuat selama 15 detik. Inkubasi diulangi lagi selama 2-15 menit pada suhu 15-25 °C. Untuk memisahkan protein, setelah inkubasi homogenat disentrifugasi 12000 g selama 15 menit pada suhu 2-8 °C. Pada tahap ini dalam mikrotube terlihat tiga fase: fase air tidak berwarna di bagian atas mengandung RNA, sedangkan interfase dan fase organik berwarna merah di bagian bawah mengandung DNA dan protein.

Karena DNA dan protein tercampur pada interfase dan fase organik, maka keduanya harus dipisahkan dengan mengendapkan DNA. DNA diendapkan dengan menambahkan 0,3 mL EtOH 75%, kemudian dicampur rata dengan membalik-balik tabung. Inkubasi diulangi lagi pada suhu 15-25 °C selama 2-3 menit dan sentrifugasi 2000 g selama 5 menit pada suhu 2-8 °C. Supernatan mengandung protein, fenol dan EtOH selanjutnya dapat disipman pada suhu 2-8 °C.

Protein dipisahkan dari fenol dan EtOH dengan cara presipitasi. Sebanyak 1,5

mL isopropanol ditambahkan ke supernatan fenol-EtOH dan tabung dibalik-balik beberapa kali, kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25 °C untuk mengendapkan protein. Untuk memisahkan protein (yang berupa presipitat) sampel disentrifugasi 12000 g selama 10 menit pada suhu 2-8 °C dan supernatan dibuang.

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

Endapan protein yang telah dicuci 3 kali kemudian ditambah 2 mL EtOH 100% lalu divorteks. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25 °C dan disentrifugasi 7500 g selama 5 menit pada suhu 2-8 °C. Supernatan dibuang, sedangkan kelebihan EtOH dibuang dengan pengering udara. Endapan protein dilarutkan dengan menambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 1% dalam aquadest dengan dipipet beberapa kali. Endapan yang sudah dilarutkan kemudian disentrifugasi 10000 g selama 10 menit pada suhu 2-8 °C. Supernatan yang terbentuk mengandung isolat protein dan dapat disimpan pada suhu 4 °C. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan mengukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm dan membandingkannya terhadap standar.

### Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan SDS-PAGE sesuai dengan metode Laemmli. Gel terdiri atas dua lapis, yaitu gel pemisah di bawah dan gel pemampat di atas. Gel pemisah dibuat dengan mencampur 9 mL akrilamid/bisakrilamid (30:1), 6, 8 mL Tris HCl 1,5 M pH 8,6, 10,4 mL aquabides, 296 uL SDS 10%, 200 uL APS 10% dan 20 uL TEMED. Campuran gel pemisah dituang ke cetakan

yang terbuat dari dua lempeng kaca sampai kurang lebih 3/4nya lalu dibiarkan mengeras. Selanjutnya dibuat campuran gel pemampat dengan mencampur 6,1 mL akrilamid/bisakrilamid, 4 mL Tris HCl 0,5 M pH 6, 8, 9,3 mL aquabides, 170 uL SDS 10% dan 150 uL APS 10% dan 15 uL TEMED. Volume sample disesuaikan sehingga total mengandung protein sebanyak 50 ug. Sampel dicampur dengan dapar sampel dan  $\beta$  merkaptotanol. Perbandingan dapar sampel dengan  $\beta$ merkaptotanol adalah 19:1. Sampel divorteks dan disentrifugasi secukupnya lalu dipanaskan pada suhu 95-100°C selama 3-5 menit.

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

### Western Blott

Protein yang telah terpisah dalam gel di transfer ke kertas nitroselulosa (BioRad) dengan alat Semi Dry Trans Blott (BioRad) selama 2 jam, 400mA. Untuk memastikan transfer protein berhasil, maka dilakukan perendaman dengan Ponceau Red, yang memberikan hasil berupa pita-pita protein pada membran nitroselulosa. Protein petanda yang muncul berupa pita-pita protein pada membran nitroselulosa ditandai dengan menggunakan pena. Selanjutnya membran nitroselulosa dicuci dengan aquadest sampai warna merah dari Ponceau Red menghilang. Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan susu skim 10%. Kemudian inkubasi selama 2 jam 37° C, lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali selama 5 menit. Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan Antibodi primer (Anti HIF-1 $\alpha$ , Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:500 ). Setelah itu inkubasi selama semalam pada suhu 4 C°,

lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali. Masukkan kertas nitroselulose ke dalam larutan Antibodi sekunder, anti IgG *Mouse* berlabel peroksidase (Santa Cruz Biotechnology, pengenceran 1:1000), inkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C, lalu cuci dengan PBS-Tween 20, 3 kali. Reaksi enzimatis ini terdiri dari 2,5 ml aseton, 25 uL larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 3-Aminoethyl-Carbazole (Sigma Aldrich) dan buffer asetat 0,5 M pH 5,0. Rendam kertas nitroselulose dalam campuran senyawa di atas dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 20 menit atau semalam pada suhu 4 C°, kemudian diperhatikan ada/tidak pita berwarna coklat.

#### **Real Time PCR untuk penetapan kadar mRNA HIF-1 $\alpha$ dengan iScript One Step RT-PCR with SYBR Green**

Protokol reaksi:

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

Sintesis cDNA 10 menit pada 50°C

Inaktivasi Iscript Reverse Transcriptase

5 menit pada 95 °C

Siklus PCR dan deteksi

10 detik pada 95°C

30 detik pada 60 °C

30 detik pada 72°C

(Pengumpulan data)

*Melt Curve analysis*

1 menit pada 95 °C

1 menit pada 55 °C

10 detik pada 55-95 °C

Untuk memeriksa spesifisitas reaksi RT-PCR dilakukan analisis produk. Hal ini dilakukan dengan menggunakan fungsi *melting curve* pada instrumen. Hasil yang baik haruslah menghasilkan satu puncak pada *melting curve* yang menunjukkan *melting temperature* (T<sub>m</sub>, suhu dimana 50% dari pasangan duplex DNA terpisah) dari ampikon. Analisis *melting curve* ini juga dapat menunjukkan adanya primer dimer

bila terdapat lebih dari satu puncak.

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

Metode analisis data RT-PCR secara umum dibagi menjadi dua, yaitu kuantifikasi absolut dan kuantifikasi relatif. Kuantifikasi absolut didapat dari perbandingan nilai CT sampel dan kurva standar. Hasilnya adalah kuantitas dari asam nukleat (ug, jumlah copy) per jumlah sampel yang digunakan (per sel atau jumlah total RNA). Sementara analisis kuantifikasi relatif adalah dengan rasio jumlah relatif asam nukleat target sejumlah yang sama dan control sampel A dan B. Metode ini dipakai untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi suatu gen target pada sel normal dibandingkan dengan gen target pada kelompok perlakuan. Hasilnya dapat dilihat berupa peningkatan atau penurunan relatif gen target pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kalibratornya.

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

## **HASIL**

Ginjal merupakan organ yang secara fisiologis berada pada kondisi hipoksia. Tekanan oksigen ginjal berkisar antara 10-30 mmHg. Hal ini disebabkan struktur anatomis vaskularisasi ginjal yang memungkinkan terjadinya difusi oksigen antara pembuluh darahnya (Nangaku *et al.*, 2008; Haase, 2006; O'Connor, 2006; Nangaku, 2006; Nangaku and Fujuta, 2008; Weidwmann *et al.*, 2008).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 8% dan nitrogen 92% selama 14 hari. Dari penelitian Ferdinal *et al* (2009) yang menggunakan objek penelitian yang sama, dilakukan analisis gas darah yang diambil dari aorta saat dilakukan pembedahan. Terlihat adanya penurunan parameter yang mengindikasikan telah terjadinya hipoksia dengan melihat penurunan tekanan parsial  $O_2$ ,  $pCO_2$ , dan saturasi oksigen yang sejalan dengan lamanya hipoksia (Tabel 1).

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

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

Adaptasi sel terhadap kondisi hipoksia ini dapat terlihat dari perubahan

protein pada masing-masing kelompok seperti terlihat pada Gambar 1.

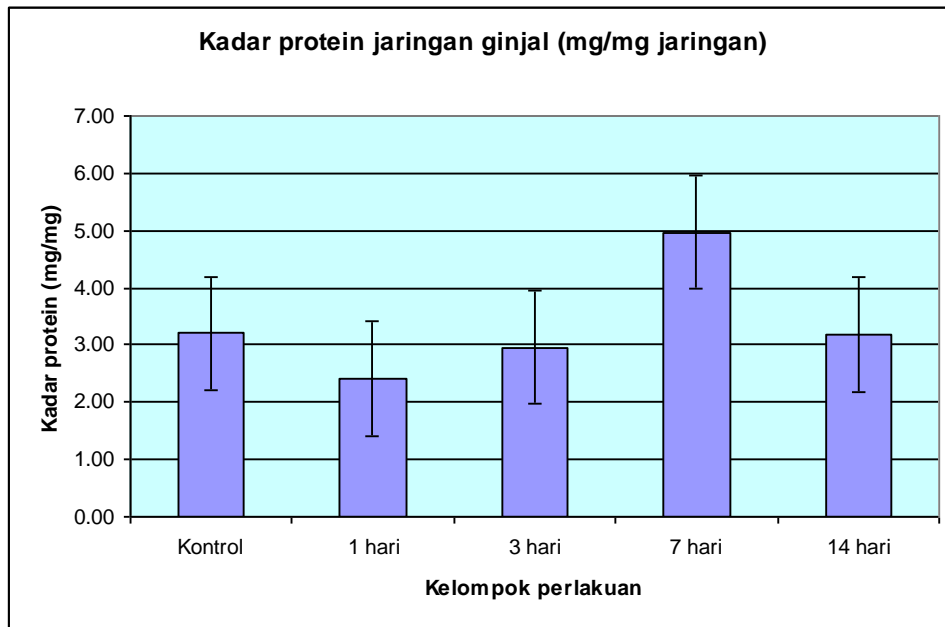
Secara statistik, tes normalitas dengan Kolmogorov Smirnov maupun Saphiro Wilk menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ( $p>0.05$ ). Analisis dilanjutkan dengan uji parametric dengan metode ANOVA *one way* yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar protein antar kelompok ( $p>0.05$ ). Namun bila dilihat Gambar 1 dapat terlihat perbedaan yang cukup signifikan antara kelompok perlakuan. Penilaian secara statistik tidak dapat dijadikan dasar pada pengamatan biologis. Hal ini terlihat pada hasil Western Blotting protein HIF-1 $\alpha$  (Gambar 2).

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

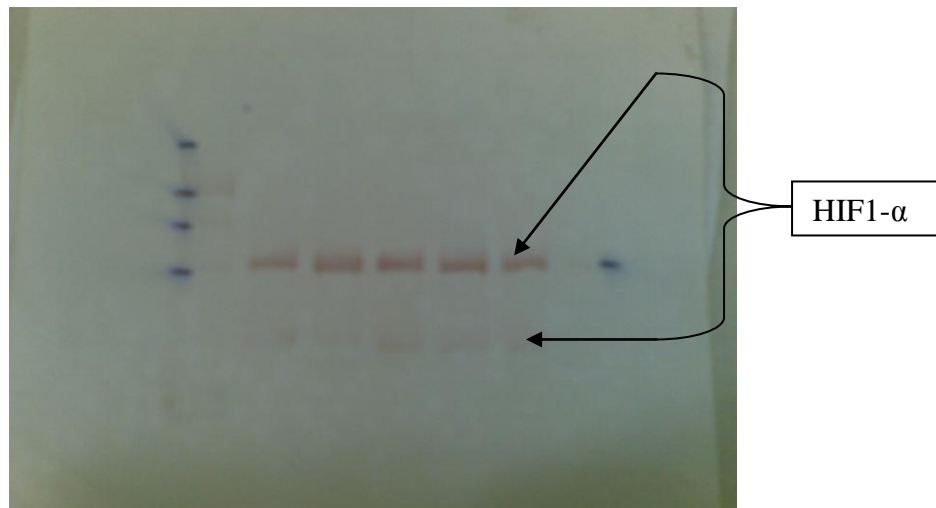
Tabel 1. Hasil analisis gas darah dan berat hewan coba

Parameter	normoksia	hipoksia					
		1 hari	3 hari	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari
pO <sub>2</sub> arteri, mmHg	96.4± 4.8	56.2± 6	51± 5.2	44.6± 4	35.6± 3.1	30.1± 4.5	24.7± 2.6
pCO <sub>2</sub> arteri, mmHg	40.4 ±2.7	36.2± 2.2	33.3± 2.2	29± 3.3	23.7± 2.4	20.1± 1.9	18.2± 3.4
saturasi O <sub>2</sub> arteri, %	94.1±3.1	65.2± 6.2	60.2± 5.5	57.3± 5.4	52.9± 8.6	36.3± 5.7	25.2± 5.4
pH	7.39± 0.01	7.4± 0.02	7.4± 0.01	7.4± 0.02	7.37± 0.01	7.36± 0.02	7.36± 0.02
BB akhir, g	178	175	209	206	210	*	*
Berat rata-rata ginjal, mg	612	617	745	754	767	*	*
Rasio BG/BB (mg/g)	3.438202247	3.5257143	3.5645933	3.6601942	3.652381	*	*

Tabel analisis gas darah dikutip dari penelitian Ferdinal *et al* (2009) dari proyek hipoksia yang sama.



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



Gambar 2. Hasil foto Western Blot protein HIF 1 $\alpha$  ginjal tikus kelompok kontrol dan kelompok hipoksia sistemik

Pada perhitungan densitas rata-rata piksel menggunakan software Adobe Photoshop CS2, didapatkan hasil seperti Gambar 3.

### Kadar RNA Total

Hasil total RNA sampel yang berhasil diisolasi diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm agar dapat ditentukan

konsentrasi RNA total masing-masing sampel. Kadar RNA total ini digunakan untuk menyamakan jumlah RNA yang akan digunakan pada RT-PCR kurang lebih sama yaitu 500 ug tiap sampel dengan cara mengatur volume dan pengenceran RNA total yang digunakan pada tiap campuran RT-PCR.

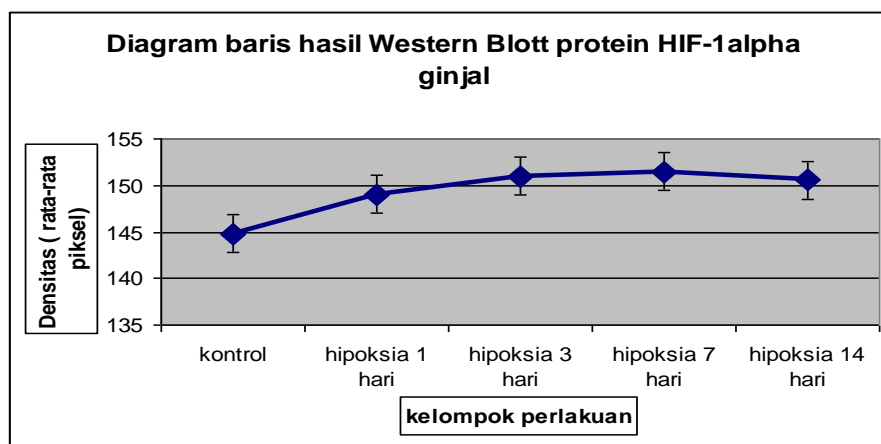
### Rasio mRNA HIF-1 $\alpha$ jaringan ginjal pada kondisi normoksia, hipoksia 1, 3, 7, dan 14 hari

Sebelum RT-PCR mRNA HIF-1 $\alpha$  dijalankan, terlebih dahulu dilakukan optimalisasi dengan mencari suhu *annealing* dan melihat *melting curve* menggunakan primer HIF-1 $\alpha$  dan primer  $\beta$  aktin. Primer HIF-1 $\alpha$  memiliki Tm 62,4°C dan Tm untuk primer  $\beta$  aktin adalah 49°C. setelah dilakukan optimalisasi, maka RT-PCR dijalankan pada suhu 58°C. Primer yang digunakan menunjukkan kekhususan dengan melihat hasil *melting curve* keduanya berupa satu puncak sehingga cukup layak digunakan (Gambar 4).

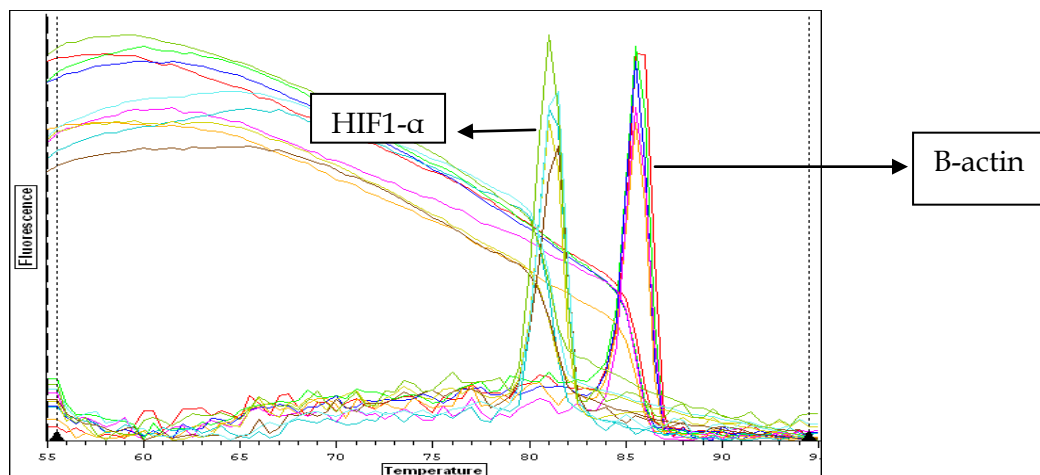
Langkah selanjutnya adalah menjalankan RT-PCR yang diikuti dengan analisis

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

Dari hasil RT-PCR yang didapatkan, terlihat nilai efisiensi yang sangat bervariasi, oleh karena itu tingkat ekspresi relatif mRNA HIF-1 $\alpha$  ditentukan berdasarkan rumus Pfaffl (Bio-Rad, 2006. Selain nilai efisiensi, terdapat nilai lain yang diperlukan dalam analisis



Gambar 3. Diagram baris hasil pengukuran densitas pada foto Western Blott HIF-1 $\alpha$



Gambar 4. Melting curve beta aktin dan HIF-1 $\alpha$

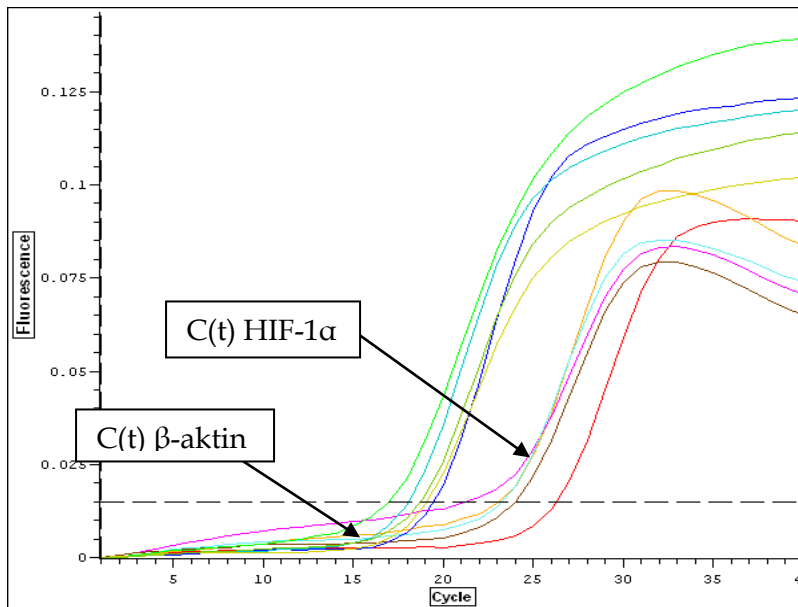


hasil RT-PCR, yaitu  $C(t)$ . Nilai  $C(t)$  ditentukan oleh alat Real Time RCR secara otomatis berdasarkan perpotongan kurva dengan garis threshold (Gambar 5).

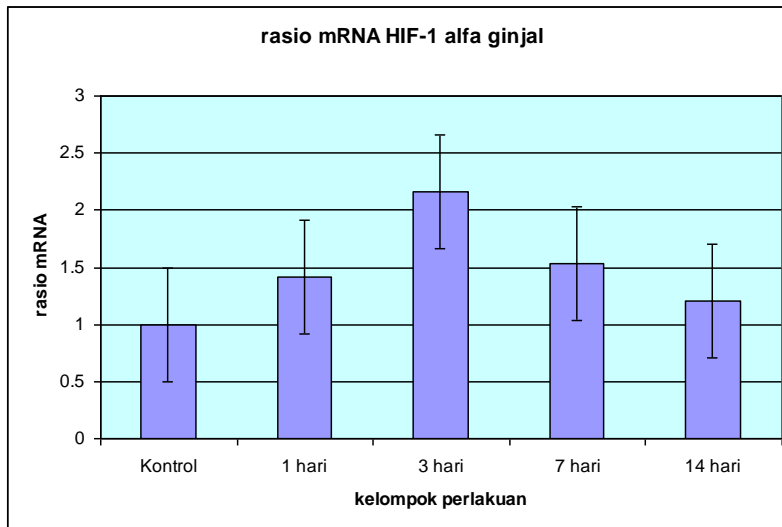
Analisis data RT-PCR mRNA HIF-1 $\alpha$  dilakukan dengan metode Paffl yang didasari atas ketidakseragaman efisiensi amplifikasi antara gen target (HIF-1 $\alpha$ ) dan gen referen ( $\beta$ -aktin) (Bio-Rad, 2006). Hasilnya menunjukkan adanya peningkatan rasio ekspresi

mRNA HIF-1 $\alpha$  yang terlihat pada Gambar 6.

Hasil analisis data dengan menggunakan metode one way ANOVA menunjukkan adanya peningkatan rasio ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  sejalan dengan lamanya hipoksia hingga hari ke 7 diikuti dengan penurunan rasio ekspresi mRNA pada hipoksia 14 hari (Gambar 6). Namun secara statistik peningkatan rasio mRNA HIF-1 $\alpha$  ini tidak bermakna ( $p > 0.05$ ).



Gambar 5.  $C(t)$   $\beta$ -aktin dan HIF-1 $\alpha$



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

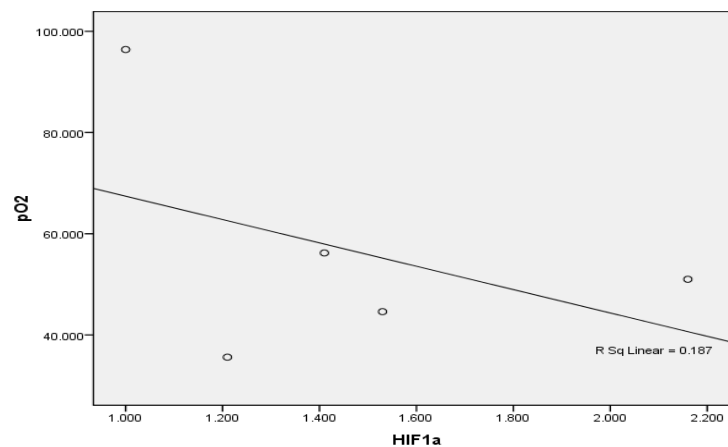
### Hubungan antara mRNA dan protein HIF-1 $\alpha$ dengan pO<sub>2</sub>

Untuk dapat melihat apakah terdapat korelasi antara hipoksia dengan kadar mRNA HIF-1 $\alpha$ , dilakukan analisis korelasi menggunakan metode Pearson. Hasil analisis menunjukkan adanya korelasi negatif kuat ( $R=-0.432$ ,  $p>0.05$ ) yang menggambarkan bahwa semakin rendah pO<sub>2</sub>, semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 $\alpha$  dan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kadar pO<sub>2</sub> dan mRNA HIF-1 $\alpha$  (Gambar 7).

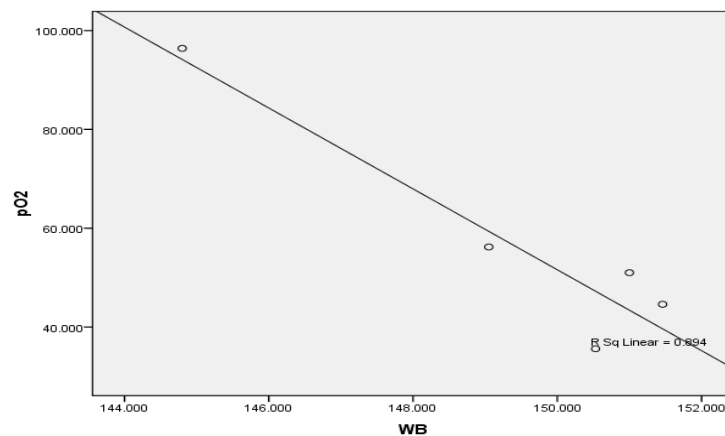
Sementara untuk korelasi pO<sub>2</sub> dengan hasil Western Blott dengan uji korelasi Pearson (Gambar 8), terdapat korelasi negatif yang sangat kuat dan terdapat perbedaan bermakna antar kadar saturasi O<sub>2</sub> dan hasil

Western Blott ( $R=-0.946$ ,  $p<0.05$ ). Analisis ini menggambarkan bahwa semakin rendah kadar saturasi O<sub>2</sub>, semakin tinggi ekspresi HIF-1 $\alpha$  dan terdapat perbedaan bermakna antara kadar saturasi O<sub>2</sub> dan hasil Western Blott HIF-1 $\alpha$ .

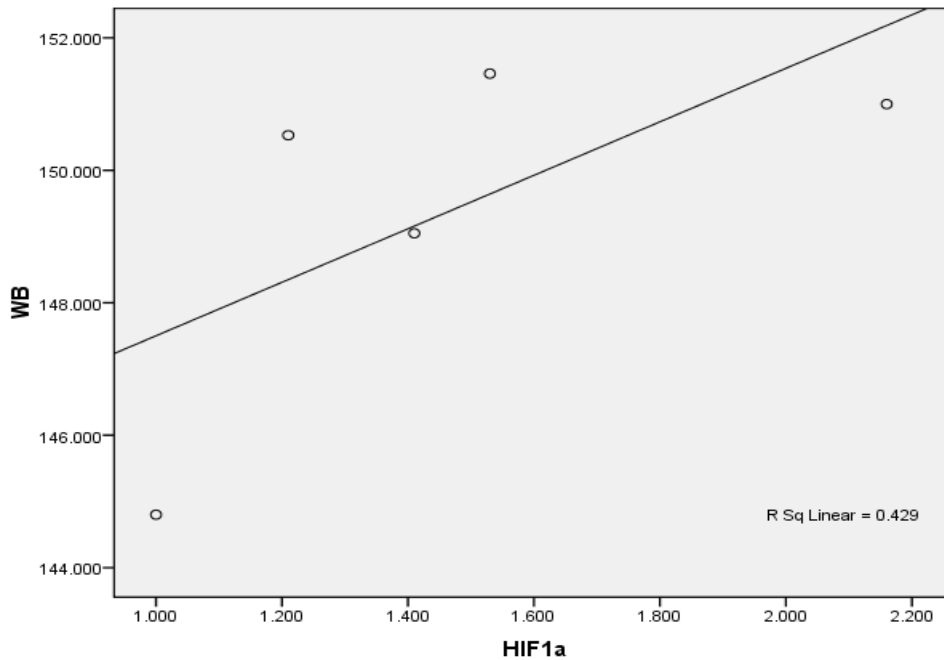
Untuk korelasi antara hasil Western Blott dengan rasio mRNA, juga dilakukan analisis menggunakan korelasi Pearson yang menunjukkan adanya korelasi kuat ( $R=0.655$ ) dan  $p>0.05$ . Korelasi bernilai positif karena semakin tinggi rasio mRNA HIF-1 $\alpha$ , semakin tinggi nilai densitas hasil Western Blott HIF-1 $\alpha$  namun tidak terdapat perbedaan bermakna antar keduanya (Gambar 9).



Gambar 7. Diagram scatter untuk korelasi pO<sub>2</sub> dengan mRNA HIF-1 $\alpha$  ginjal



Gambar.8. Diagram scatter untuk korelasi saturasi O<sub>2</sub> dengan hasil Western Blott HIF-1 $\alpha$  ginjal



Gambar 9. Diagram scatter untuk korelasi mRNA dan Hasil Western Blott HIF-1 $\alpha$  ginjal

## PEMBAHASAN

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

Pada Gambar 2 terlihat ekspresi protein HIF-1 $\alpha$  yang ditandai dengan pita berwarna kecoklatan. Pada kelompok kontrol (K), sudah dapat terlihat pita kecoklatan yang

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

Stabilisasi HIF-1 $\alpha$  disebabkan oleh tidak aktifnya enzim prolil hidroksilase yang membutuhkan oksigen sebagai salah satu substratnya. Ketidakaktifan enzim prolil hidroksilase akan menyebabkan HIF-1 $\alpha$  tidak mengalami hidroksilasi pada residu prolin sehingga tidak dapat dikenali oleh pVHL dan

berakibat tidak dapat didegradasi oleh kompleks proteasom. HIF-1 $\alpha$  akan membentuk dimer dengan HIF-1 $\beta$  menghasilkan HIF-1 yang merupakan factor transkripsi bagi banyak gen yang mengatur respon adaptif terhadap hipoksia. Stabilisasi HIF-1  $\alpha$  ini akan terus berlangsung sepanjang sel tersebut mampu mempertahankan diri pada kondisi hipoksia. Bila sel tersebut sudah tidak mampu lagi mempertahankan respon adaptif tadi, maka sel tersebut akan mengalami apoptosis.

Pada Gambar 6, sudah terdapat ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan pada kondisi fisiologis ginjal relatif berada dalam kondisi hipoksia. Peningkatan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  terjadi sebanyak 1,4 kali lipat dibanding kontrol pada kelompok hipoksia 1 hari, 2,16 kali lipat pada 3 hari, 1,53 kali lipat pada hipoksia 7 hari dan 1,21 pada hipoksia 14 hari.

Terdapatnya ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada kelompok kontrol (normoksia), dapat disebabkan oleh kondisi fisiologis jaringan ginjal yang relatif hipoksia. Hal ini juga dapat terlihat pada penelitian Heidbreder (2003) yang memberikan hasil yang sama dengan dijumpainya ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  pada kelompok normoksia ginjal (Heidbreder *et al.*, 2003). Pada kondisi awal hipoksia (1 dan 3 hari), terlihat sel sedang mengalami adaptasi sehingga ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  terjadi peningkatan. Peningkatan rasio ekspresi mRNA dapat disebabkan karena adanya respon adaptasi sel untuk tetap bertahan pada kondisi hipoksia. Respon adaptif ini dimotori oleh HIF-1 $\alpha$  karena protein ini memang merupakan suatu master gen yang mengatur banyak gen dalam kondisi hipoksia, diantaranya gen untuk eritopoesis, angiogenesis, metabolisme an aerob karbo-hidrat, proliferasi sel dan apoptosis (Ke and Costa, 2006).

Pada kondisi hipoksia 7 dan 14 hari mulai terjadi penurunan ekspresi HIF-1 $\alpha$  bila

dibandingkan kelompok hipoksia 1 dan 3 hari namun tetap lebih tinggi bila dibandingkan kontrol. Penurunan ekspresi ini dapat disebabkan oleh mulai adanya penekanan ekspresi mRNA HIF-1 $\alpha$  oleh protein HIF-1 $\alpha$  yang sudah banyak terstabilisasi atau karena sel sudah mulai kehilangan daya adaptasinya terhadap hipoksia (Lidgren *et al.*, 2008).

## SIMPULAN

Kadar protein total jaringan ginjal meningkat secara bertahap sesuai dengan lamanya hipoksia lalu mulai menurun pada hari ke 14. Hasil Western Blott serta peningkatan rasio mRNA HIF-1 $\alpha$  dan ekspresi protein HIF-1 $\alpha$  meningkat secara bertahap sesuai dengan lamanya hipoksia, tetapi tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Masih diperlukan penelitian-penelitian lanjutan mengenai pengaruh hipoksia pada gagal ginjal kronik dan pengaruh hipoksia terhadap ekspresi protein-protein yang menyebabkan kondisi gagal ginjal kronik.

## Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. dr. M. Sadikin, Dsc dan dr. Ani Retno Prijanti, MS atas bimbingan yang diberikan, dan terima kasih kepada Yayasan YARSI dan DRPM UI atas dana yang diberikan.

## KEPUSTAKAAN

- Bio-Rad 2006. Laboratorium. RT- PCR application guide book.
- Bio-Rad 2006. Transblot guide book.
- Bruick RK 2003. Oxigen sensing in hypoxic response pathways: regulation of the hypoxia Inducible Transcription Factor. *Gene and development*. 17:2614-2623.
- Burnette WN 1981. Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. [Anal Biochem](#). Apr;112(2):195-203.

- Corn PG 2007. Role of the ubiquitin proteasom system in renal cell carcinoma. *BMC Biochemistry*; 8 (1): S4.
- Ferdinal F *et al.* 2009. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran Hypoxia Inducible Factor-1 dalam regulasi ekspresi gen B-Type Natriuretic Peptide-45.
- Galban S, Kuwano Y, Pullmann R Jr., *et al.* 2008. RNA binding protein HuR and PTB promote the translation of HIF 1. *Mol Cell Biol*; 28 (10) : 93-107.
- Haase VH 2006. HIF in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 291: 271-281.
- Heidbreder M *et al.* 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3 $\alpha$  mRNA expression. *The FASEB Journal*. express article 10.1096/fj.02-0936fje.
- Huang LE, Bunn HF 2003. Hypoxia Inducible Factor and its biomedical relevance. *The Journal of Biological Chemistry*; 278 (22): 19575-19578.
- Ke Q, Costa M 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 70: 1469-1480.
- Kojima I, Tanaka T, Inagi R *et al.* 2007. Protective role of hypoxia Inducible Factor 2 $\alpha$  against ischaemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol*; 18: 1218-1226.
- Lidgren A *et al.* 2008. Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  mRNA and Protein Levels in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer Molecules*. 4(5): 153-157.
- Nangaku M 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 17: 17-25.
- Nangaku M 2007. The heat is on: expanding role for Hypoxia-inducible factor in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 18:13-15.
- Nangaku M, Eckardt KU 2007. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *Journal of molecular medicine*; 85 (12): 1325-1330.
- Nangaku M, Fujuta T 2008. Activation of renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens res*. 31: 175-184.
- Nangaku M, Nishi H, Miyata T 2008. Role of chronic hypoxia and hypoxia Inducible Factor in kidney disease. *Chinese Med. J*; 121 (3): 257-264.
- O'Connor PM 2006. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 33: 961-967.
- Semenza GL 2000. HIF 1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 88:1474-148.
- Soewoto H, Sadikin M, MM Vita K, Septelia IW, Dwirini RG, Parwati AS, Ani RP, Indriati PH, Sri Widia AJ 2001. *Biokimia Eksperimen Laboratorium*. Widya Medika, 1-6.
- Srigondo B 1981. Jumlah Ulangan dalam percobaan, dalam rancangan percobaan. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Thomas JD, Johannes GJ 2007. Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA J*; 13 : 1116-1131.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sd. USA* 76:4350-4.
- Wang GL *et al.* 1995. HIF 1 ia a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad sci USA*. 92: 5510-5514.
- Wang GL, Semenza GL 1995. Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *Journal of biological chemistry*. 20: 1230-1237.
- Weidwmann A *et al.* 2008. HIF actifation protect from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 19: 486-494.
- Weinberg JM 1991. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney International*. 39: 476-500.