



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 α* , MIOGLOBIN DAN
B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE-43 PADA JANTUNG TIKUS
SEBAGAI RESPONS ADAPTASI PADA PAPARAN
HIPOKSIA HIPOBARIK INTERMITEN**

TESIS

MARGARETHA HERAWATI
NPM: 1306362642

FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2016



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 α* , MIOGLOBIN DAN
B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE-45 PADA JANTUNG TIKUS
SEBAGAI RESPONS ADAPTASI PADA PAPARAN
HIPOKSIA HIPOBARIK INTERMITEN**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister dalam Ilmu Biomedik

MARGARETHA HERAWATI
NPM: 1306362642

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2016**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Margaretha Herawati

NPM : 1306362642

Tanda tangan :



Tanggal : 10 Juni 2016

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Margaretha Herawati
NPM : 1306362642
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* , mioglobin dan *b-type natriuretic peptide-45* pada jantung tikus sebagai respons adaptasi pada paparan hipoksia hipobarik intermiten

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

DEWAN PENGUJI :

Pembimbing I : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc



Pembimbing II : Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS



Penguji I : Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS



Penguji II : dr. Wawaimuli Azozi, PhD, MBiomed



Penguji III : Dr. dr. Wawan Mulyawan, Sp.BS, AAK



Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 10 Juni 2016

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik :
Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wamandi



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

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

Nama : Margaretha Herawati

NPM : 1306362642

Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik

Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Tesis

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

**Eksresi *Hypoxia Inducible Factor-1 α* , Hinglobin dan
B-type Natriuretic Peptide-45 pada Jantung Tikus sebagai
Respons Adaptasi pada Paparan Hipoksia Hipobarik Intermiten**

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir 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 : 10 Juni 2016

Yang menyatakan,



(Margaretha Herawati)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, penulis akhirnya dapat menyelesaikan tesis dengan baik. Tesis ini merupakan prasyarat agar dapat memperoleh gelar Magister dalam Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama proses pendidikan mulai dari awal hingga akhir, banyak sekali pengalaman yang didapatkan oleh penulis.

Selama proses penyusunan tesis ini, penulis mengalami keterbatasan dalam mengerjakan penelitian. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada beberapa pihak yang telah mendukung keberhasilan penyusunan tesis ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc selaku pembimbing pertama
2. Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS selaku pembimbing kedua
3. Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan Kepala Laboratorium Biologi Molekuler FKUI
4. Dr. dr. Ani Retno Prijanti, MS selaku Kepala Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI
5. Prof. Dr. dr. Sri Widia A Jusman, MS selaku penguji pertama dan Ketua Kekhususan Biokimia Program Magister Ilmu Biomedik FKUI
6. dr. Wawaiful Azzam, PhD, Mbiomed selaku penguji kedua
7. Dr. dr. Wawan Mulyawan, SpBS, AAK selaku penguji ketiga
8. Para staf pengajar Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI
9. Para staf administrasi dan laboran Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI
10. Para staf sekretariat Program Magister Ilmu Biomedik FKUI

11. Dr. drg. Paulus Januar, MS selaku Dekan FKG UPDM (B)
12. Para staf pengajar FKG UPDM (B)
13. Cahya Chandra, Febrial Hikmah, Pak Anton Syailendra, Rizky Kusuma Wardani dan teman-teman Program Magister Ilmu Biomedik FKUI angkatan 2013 term 1
14. Mama, papa, adik, suami, calon bayi, serta keluarga yang selalu memberi motivasi, dukungan dan doa

Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dan semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 10 Juni 2016



Margaretha Herawati

ABSTRAK

Nama : Margaretha Herawati
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul : Ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* , *mioglobin* dan *b-type natriuretic peptide-45* pada jantung tikus sebagai respons adaptasi pada paparan hipoksia hipobarik intermiten

Latar Belakang : Penelitian ini menganalisis respons adaptasi jaringan jantung pada paparan hipoksia hipobarik intermiten (HHI) pada tikus. Faktor transkripsi HIF-1 α penting untuk mengatasi keadaan hipoksia, terdiri atas 2 subunit yaitu HIF-1 α dan HIF-1 β yang dalam keadaan hipoksia membentuk heterodimer dan mengatur ekspresi sejumlah gen target untuk mengatasi keadaan hipoksia. Hipoksia akan menyebabkan jantung mengalami beban yang meningkat berupa hipertrofi ventrikel. Jantung akan mengatasi keadaan tersebut melalui pembentukan Mb dan BNP-45.

Metode : 25 ekor tikus jantan *Sprague-Dawley* dibagi dalam 5 kelompok dan 4 kelompok dipaparkan HHI menggunakan *hypobaric chamber* di Lakespra Saryanto TNI AU, selama 50 menit dengan variasi ketinggian, interval intermiten 1 minggu, 4 kali perlakuan (hari 1, 8, 15 dan 22). Dilakukan pengukuran protein HIF-1 α dan Mb (ELISA), ekspresi relatif mRNA Mb dan BNP-45 (real time RT-PCR satu langkah).

Hasil : Kadar protein HIF-1 α meningkat pada paparan hipoksia hipobarik dan terus menurun hingga induksi hipoksia hipobarik intermiten 3 kali (ANOVA, $p=0,0437$). Ekspresi mRNA dan protein Mb meningkat pada paparan hipoksia hipobarik dan terus menurun hingga induksi hipoksia hipobarik intermiten 3 kali (ANOVA, $p=0,0283$; $0,0170$), dan keduanya berkorelasi kuat (Pearson, $r=0,6307$). Ekspresi mRNA BNP-45 meningkat pada paparan hipoksia hipobarik intermiten 1 kali dan terus menurun hingga induksi hipoksia hipobarik intermiten 3 kali (ANOVA, $p=0,0314$). Hasil uji korelasi juga menunjukkan hubungan yang kuat antara protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA Mb, namun sangat lemah dengan ekspresi mRNA BNP-45.

Kesimpulan : Terjadi respons adaptasi HIF-1 α , Mb dan BNP-45 pada paparan hipoksia hipobarik intermiten pada jantung tikus. Protein HIF-1 mengatur ekspresi Mb dan BNP-45.

Kata Kunci : hipoksia hipobarik intermiten, HIF-1 α , mioglobin, BNP-45

ABSTRACT

Name	: Margaretha Herawati
Study Program	: Program Magister Ilmu Biomedik
Title	: The expression of hypoxia inducible factor-1 α , myoglobin and b-type natriuretic peptide-45 in heart rat tissue as adaptive response on intermittent hypobaric hypoxia exposure

Background: The study analyzed the adaptive responses of heart tissue after induction of intermittent hypobaric hypoxia (IHH) in rat. The transcription factor HIF-1 is important to overcome hypoxia condition, which consist of 2 subunits: HIF-1 α and HIF-1 β in a state of hypoxia form heterodimers and regulate the expression of a number of target genes in overcome hypoxia. Hypoxia, especially continuous one, may lead the heart to hypertrophic state. The heart will overcome the situation through the establishment of Mb and BNP-45.

Methods: Twenty five male Sprague-Dawley rats were exposed to IHH in a hypobaric chamber in Indonesian Air Force Institute of Aviation Medicine, for 50 minutes at various altitudes, 1 week interval for 4 times (day 1, 8, 15 and 22). HIF-1 α and Mb protein were measured with ELISA. mRNA expression of Mb and BNP-45 were measured with one step real time RT-PCR.

Results: HIF-1 α protein levels increased after induction of hypobaric hypoxia and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0437$). mRNA expression and protein of Mb increased after induction of hypobaric hypoxia and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0283$; 0.0170), and both are strongly correlated (Pearson, $r=0.6367$). mRNA expression of BNP-45 increased after induction of intermittent hypobaric hypoxia 1 time and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0314$). Correlation test results also showed a strong relationship between HIF-1 α protein with mRNA expression of Mb, but very weak with mRNA expression of BNP-45.

Conclusions: Adaptive response of HIF-1 α , Mb and BNP-45 occurs after induction of intermittent hypobaric hypoxia in rat heart. HIF-1 protein regulated the expression of Mb and BNP-45.

Keywords: intermittent hypobaric hypoxia, HIF-1 α , Mb, BNP-45.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Hipotesis Penelitian.....	5
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.4.1. Tujuan Umum.....	5
1.4.2. Tujuan Khusus.....	6
1.5. Manfaat Penelitian.....	6
1.6. Kerangka Teori.....	7
1.7. Kerangka Konsep.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Oksigen.....	9
2.2. Pengukuran Oksigen (<i>Oxygen Sensing</i>).....	9
2.3. Hipoksia.....	10
2.4. <i>Hypoxia Inducible Factor-1</i> (HIF-1).....	10
2.5. Hipoksia pada Ketinggian (Hipoksia Hipobarik).....	12
2.6. <i>Hypobaric Chamber Training</i>	12
2.6.1. <i>Hypobaric Chamber Training</i> di Lakespra Saryanto TNI AU.....	13
2.6.1.1. ILA Awal.....	13
2.6.1.1.1. <i>Chamber Flight Profile</i> Tipe I.....	13
2.6.1.1.2. <i>Rapid Decompression Profile</i>	14
2.6.1.2. ILA Penyebaran.....	14
2.6.1.2.1. <i>Chamber Flight Profile</i> Tipe II (untuk penerbang tempur).....	14
2.6.1.2.2. <i>Chamber Flight Profile</i> Tipe II (untuk penerbang angkut).....	14
2.7. Mioglobin (Mb).....	14
2.7.1. Struktur Mioglobin.....	15
2.7.2. Lokasi dan Ekspresi Mioglobin.....	16

2.7.3. Fungsi Mioglobin.....	17
2.8. Natriuretic Peptide (NP).....	19
2.8.1. A-type Natriuretic Peptide (ANP).....	19
2.8.2. B-type Natriuretic Peptide (BNP).....	19
2.8.3. C-type Natriuretic Peptide (CNP).....	20
2.8.4. D-type Natriuretic Peptide (DNP).....	22
2.8.5. Urodilatin.....	22
2.9. Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	23
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....	24
3.1. Desain Penelitian.....	24
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.3. Sampel Penelitian.....	24
3.4. Jumlah Ulangan Tiap Variabel Bebas.....	24
3.5. Izin Etik Penelitian.....	25
3.6. Alur Penelitian.....	25
3.7. Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.7.1. Bahan Penelitian.....	26
3.7.1.1. Bahan untuk Induksi Hipoksia Tikus.....	26
3.7.1.2. Reagensia untuk Pemeriksaan Ekspresi mRNA Mb, BNP-45 dan 18S rRNA.....	26
3.7.1.3. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein HIF-1 α	26
3.7.1.4. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein Mb.....	26
3.7.1.5. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein Total.....	26
3.7.1.6. Bahan Habis Pakai.....	27
3.7.2. Alat Penelitian.....	27
3.8. Cara Kerja.....	27
3.8.1. Persiapan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel.....	27
3.8.1.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba.....	27
3.8.1.2. Induksi Hipoksia Hipobarik.....	28
3.8.1.3. Pengambilan Jaringan Jantung Tikus.....	28
3.8.2. Isolasi Protein Total Jaringan Jantung.....	28
3.8.2.1. Pembuatan Homogenat Jantung.....	28
3.8.2.2. Pengukuran Kadar Protein Total Jaringan Jantung.....	28
3.8.3. Isolasi RNA Total Jaringan Jantung.....	29
3.8.3.1. Tahap 1: Persiapan Sampel.....	29
3.8.3.2. Tahap 2: Lisis Sel.....	29
3.8.3.3. Tahap 3: Pengikatan RNA.....	30
3.8.3.4. Tahap 4: Pencucian.....	30
3.8.3.5. Tahap 5: Elusi RNA.....	30
3.8.3.6. Perhitungan Konsentrasi dan Kemurnian RNA Total.....	30
3.8.3.7. Pengenceran Sampel RNA Total Hasil Isolasi Menjadi Larutan Induk RNA Cetakan.....	31
3.8.4. Desain Primer.....	31
3.8.4.1. Karakteristik Primer.....	31
3.8.4.2. Desain dan Analisis Primer.....	31

3.8.5. Analisis Ekspresi mRNA Mb dan BNP-45 dengan <i>Real Time RT-PCR</i> Satu Langkah.....	32
3.8.5.1. Optimisasi Suhu <i>Annealing</i> Primer.....	32
3.8.5.2. Amplifikasi cDNA.....	33
3.8.5.3. Analisis Ekspresi 18S rRNA, Mb dan BNP-45.....	34
3.8.6. Penentuan Kadar HIF-1 α dan Mb dengan Teknik ELISA.....	34
3.8.6.1. Pembuatan Homogenat Jaringan Jantung.....	34
3.8.6.2. Preparasi Reagen dan Sampel.....	35
3.8.6.3. Pembuatan Kurva Standar.....	35
3.8.6.4. Prosedur Pengukuran Kadar HIF-1 α dan Mb dengan ELISA.....	37
3.9. Analisis Statistik.....	37
BAB 4 HASIL PENELITIAN	39
4.1. Isolasi dan Kadar RNA Total.....	39
4.2. Kadar Protein Total Jantung Tikus.....	39
4.3. Desain Primer Mb, BNP-45 dan 18S rRNA.....	41
4.4. Hasil Optimisasi Suhu <i>Annealing</i> Primer.....	42
4.5. Pengaruh Hipoksia terhadap Stabilisasi Protein HIF-1 α	42
4.5.1. Analisis Kadar Protein HIF-1 α pada Jantung Tikus dengan Metode ELISA.....	42
4.6. Regulasi Ekspresi Mb pada Jantung Tikus Hipoksia.....	44
4.6.1. Analisis Ekspresi Relatif mRNA Mb pada Jantung Tikus Hipoksia.....	44
4.6.2. Analisis Kadar Protein Mb pada Jantung Tikus dengan Metode ELISA.....	45
4.7. Regulasi Ekspresi BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia.....	47
4.7.1. Analisis Ekspresi Relatif mRNA BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia.....	47
4.8. Hasil Uji Korelasi Ekspresi Relatif mRNA Mb dengan Kadar Protein Mb.....	48
4.9. Hasil Uji Korelasi Kadar Protein HIF-1 α dengan Ekspresi Relatif mRNA Mb.....	49
4.10. Hasil Uji Korelasi Kadar Protein HIF-1 α dengan mRNA BNP-45.....	50
BAB 5 PEMBAHASAN	51
5.1. Ekspresi HIF-1 α pada Jantung Tikus Hipoksia Hipobarik Intermiten.....	52
5.2. Ekspresi Mioglobin pada Jantung Tikus Hipoksia Hipobarik Intermiten.....	53
5.3. Ekspresi BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia Hipobarik Intermiten.....	54
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR

No. Gambar	Judul	Halaman
2.1.	<i>Chamber Flight Profile</i> tipe 1	13
2.2.	Struktur tertier mioglobin	15
2.3.	Situs pengikatan oksigen pada mioglobin	16
2.4.	Kurva saturasi oksigen pada mioglobin dan hemoglobin	17
2.5.	Struktur biokimia dari ANP, BNP dan CNP	21
2.6.	Struktur biokimia dari DNP	22
2.7.	Struktur biokimia dari urodilatin	23
3.1.	Seri dilusi larutan standar HIF-1 α untuk pembuatan kurva standar HIF-1 α	36
3.2.	Seri dilusi larutan standar Mb untuk pembuatan kurva standar Mb	36
4.1.	Kadar RNA total rata-rata pada jantung tikus	39
4.2.	Kurva Standar BSA	40
4.3.	Kadar protein total rata-rata pada jantung tikus	41
4.4.	Kurva Standar HIF-1 α	43
4.5.	Kadar protein HIF-1 α per protein total rata-rata pada jantung tikus dengan metode ELISA	44
4.6.	Ekspresi relatif mRNA Mb pada jantung tikus	45
4.7.	Kurva Standar Mb	46
4.8.	Kadar protein Mb per protein total rata-rata pada jantung tikus dengan metode ELISA	47
4.9.	Ekspresi relatif mRNA BNP-45 pada jantung tikus	48
4.10.	Korelasi mRNA Mb dengan protein Mb	49
4.11.	Korelasi protein HIF-1 α dengan mRNA Mb	49
4.12.	Korelasi protein HIF-1 α dengan mRNA BNP-45	50

DAFTAR TABEL

No. Tabel	Judul	Halaman
2.1.	Waktu sadar efektif (TUC)	12
2.2.	Efek BNP pada ginjal, kelenjar adrenal dan jantung	20
3.1.	Prosedur pengukuran kadar protein total jantung tikus	29
3.2.	Prosedur kerja pembuatan kurva standar BSA	29
3.3.	Prosedur pembuatan <i>master mix</i> dan cetakan RNA dalam satu tabung PCR	32
4.1.	Hasil Pengukuran Isolasi RNA Total	41

DAFTAR SINGKATAN

<i>ANOVA</i>	<i>Analysis of variance</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<i>bHLH</i>	<i>basic-helix-loop-helix</i>
<i>BNP</i>	<i>B-type Natriuretic Peptide</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>EPO</i>	<i>Eritropoietin</i>
<i>GLUT</i>	<i>Glucose transporter</i>
<i>HIF-1α/β</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor-1α/β</i>
<i>HRE</i>	<i>Hypoxia Response Element</i>
<i>Mb</i>	<i>Myoglobin</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
<i>NTC</i>	<i>Non Template Control</i>
<i>ODD</i>	<i>Oxygen-deprivation Dependent Domain</i>
<i>Pb</i>	<i>pasangan basa</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
<i>pH</i>	<i>potential of Hydrogen</i>
<i>PHD</i>	<i>Profil Hydroxylase</i>
<i>pVHL</i>	<i>protein von Hippel Lindau</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
<i>Tm</i>	<i>Melting temperature</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR LAMPIRAN

No. Lampiran	Judul	Halaman
1.	Keterangan Lolos Kaji Etik	61
2.	Penghitungan kadar RNA total	63
3.	Penghitungan kadar protein total	64
4.	Desain Primer	65
5.	Penghitungan kadar protein HIF-1 α	68
6.	Penghitungan ekspresi mRNA Mb	69
7.	Penghitungan kadar protein Mb	70
8.	Penghitungan ekspresi mRNA BNP-45	71
9.	Draft artikel	72
11.	Daftar riwayat hidup peneliti	81

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Semua makhluk hidup mempertahankan proses kehidupan melalui pasokan energi bebas dari lingkungan. Energi tersebut diperoleh dari serangkaian proses metabolisme bahan makanan di dalam tubuh. Pada proses metabolisme anaerob, tidak dibutuhkan kehadiran oksigen, terjadi di dalam sitoplasma dan menghasilkan energi dalam jumlah yang kecil yaitu 2 ATP. Pada proses metabolisme aerob, dibutuhkan kehadiran oksigen, terjadi di dalam matriks mitokondria dan menghasilkan energi dalam jumlah yang besar yaitu 36 ATP. Oksigen berperan sebagai akseptor elektron pada akhir rantai pemapasan, sehingga diperoleh senyawa berenergi tinggi yaitu ATP. Proses distribusi oksigen ini melibatkan sistem respirasi (paru-paru) dan sistem peredaran darah (sel darah merah, pembuluh darah dan jantung).¹

Hipoksia merupakan suatu keadaan yang ditandai dengan sel atau jaringan tubuh mengalami kekurangan suplai oksigen.² Penurunan konsentrasi oksigen dapat terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Berbagai faktor dapat menjadi penyebab timbulnya hipoksia. Pada keadaan fisiologis, hipoksia umumnya disebabkan oleh perbedaan tekanan udara secara tiba-tiba saat berada di dataran tinggi seperti saat mendaki gunung maupun saat terbang.³ Pada keadaan patologis, hipoksia dapat terjadi secara akut maupun kronik. Hipoksia akut merupakan suatu keadaan dengan penurunan kadar oksigen secara mendadak pada tingkat jaringan. Penyebab hipoksia akut adalah obstruksi pada jalan nafas, infeksi pada paru-paru dan kegagalan mendadak pada sistem kardiovaskular. Hipoksia kronik merupakan suatu keadaan dengan penurunan kadar oksigen secara perlahan-lahan pada tingkat organ, yang dapat menyebar ke seluruh organ dan jaringan tubuh (sistemik). Hipoksia sistemik kronik dapat berlangsung berbulan-bulan bahkan bertahun-tahun. Penyebab hipoksia kronik adalah oksigenasi yang menurun di dalam darah seperti yang terjadi pada pneumonia atau penurunan kapasitas darah untuk membawa oksigen yang terjadi pada anemia.⁴

Kondisi hipoksia menyebabkan terjadinya respon secara seluler maupun sistemik. Adaptasi tubuh terhadap kondisi hipoksia melalui respon seluler akan meningkatkan resistensi sel terhadap hipoksia melalui proses eritropoiesis, angiogenesis, transportasi glukosa dan mengaktifkan jalur respirasi anaerob. Adaptasi tubuh terhadap kondisi hipoksia melalui respon sistemik akan meningkatkan denyut jantung dan tekanan darah.^{3,6}

HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) merupakan protein faktor transkripsi yang berperan meregulasi sejumlah gen dalam kondisi hipoksia. HIF merupakan protein heterodimer yang terdiri atas subunit α dan β . Pada kondisi normoksia, HIF- α didegradasi oleh enzim prolin hidroksilase. Namun pada kondisi hipoksia, protein distabilisasi dengan cara HIF- α membentuk heterodimer dengan HIF- β di inti sel. Kemudian protein berikatan di daerah promoter gen yang disebut HRE (*Hypoxia Response Element*), sehingga terjadi proses transkripsi suatu gen.⁷ Pada kondisi hipoksia, protein HIF-1 berperan penting dalam meregulasi ekspresi sejumlah gen dengan tujuan mengurangi ketergantungan sel terhadap oksigen dan meningkatkan pasokan oksigen ke jaringan.⁸ Gen yang ekspresinya dikontrol oleh HIF antara lain adalah *erythropoietin* (Epo), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *glucose transport* (GLUT) dan enzim-enzim jalur glikolisis anaerob.⁹

Manusia adalah makhluk hidup yang dapat tinggal pada daerah dengan tekanan udara normal (normobarik) sampai pada daerah dengan tekanan udara yang masih memungkinkan hidup tanpa penyesuaian fisiologis tertentu (*physiological-efficient zone*). Tekanan udara ini berkisar antara 760 mmHg (0 m di atas permukaan laut) sampai dengan 522,66 mmHg (3048 m / 10.000 kaki di atas permukaan laut). Di daerah dengan tekanan udara lebih rendah daripada tekanan udara di *physiological-efficient zone*, manusia akan mengalami penyesuaian fisiologis tertentu untuk dapat mempertahankan hidupnya. Adaptasi ini terjadi karena terdapat perbedaan gradien tekanan antara lingkungan luar tubuh dengan tekanan homeostasis tubuh (*decompression sickness*), sehingga oksigen yang dihirup menjadi lebih sedikit dan dapat menyebabkan hipoksia (hipoksia hipobarik akut).¹⁰

Tidak semua makhluk hidup dapat bertahan hidup pada keadaan hipoksia mendadak. Makhluk hidup yang dapat bertahan hidup ternyata telah mengalami mekanisme adaptasi pada keadaan hipoksia yang dilakukannya dengan cara mempertahankan homeostasis oksigen jaringan. Adaptasi tersebut dapat dicegah dengan hipoksia singkat yang dialami berulang-ulang (hipoksia prekondisi).¹¹ Hipoksia prekondisi diduga dapat berfungsi untuk meningkatkan resistensi sel terhadap keadaan hipoksia.¹² Jones, dkk., juga telah membuktikan bahwa hipoksia prekondisi dapat meregulasi ekspresi gen HIF-1 α dan profil hidroksilase pada sel otak tikus.¹³ Hidayat, dkk., telah membuktikan bahwa paparan hipoksia hipobarik intermiten dapat menurunkan tingkat stres oksidatif dan apoptosis pada sel jantung tikus.¹⁴

Semua organ vital, termasuk jantung sangat rentan terhadap hipoksia. Jantung merupakan organ aerob obligat sehingga fungsi normalnya bergantung pada kadar oksigen. Apabila hipoksia terjadi pada otot yang sedang bekerja, maka oksidasi aerob oleh mitokondria untuk menghasilkan energi (ATP) akan terganggu.¹⁵ Hipoksia mendadak pada otot jantung yang sedang bekerja dapat menyebabkan gagal jantung karena jantung tidak mampu memompa cukup darah untuk memenuhi kebutuhan metabolisme jaringan dan memerlukan penanganan segera.¹⁶

Respon spesifik jantung terhadap stres pada tingkat seluler adalah sintesis Mioglobin (Mb) dan BNP (*B-type Natriuretic Peptide*). Mioglobin banyak ditemukan di jaringan otot dan jantung vertebrata. Protein ini berfungsi mengikat dan menyimpan oksigen jaringan. Mb berikatan dengan oksigen secara reversibel, memfasilitasi transport oksigen dari sel darah masuk ke dalam sel. Puspitaningrum menyatakan bahwa pada keadaan hipoksia, oksigen yang tersimpan dalam mioglobin akan dilepaskan sedikit demi sedikit ke mitokondria untuk menghasilkan energi. Cara ini dilakukan tukik *chelonis mydas*, hewan toleran hipoksia untuk dapat beradaptasi terhadap keadaan hipoksia.¹⁷

Protein BNP (*B-type Natriuretic Peptide*) berfungsi untuk membantu jantung menghadapi beban yang meningkat, akibat dari terjadinya peningkatan tekanan atau volume jantung. Diketahui bahwa peningkatan konsentrasi BNP dalam plasma sesuai

dengan beratnya gangguan fungsi jantung. Konsentrasi BNP dalam plasma sudah diakui oleh FDA (*Food and Drug Administration*) dan dapat digunakan sebagai *marker* atau penanda gagal jantung.¹⁷ Ferdinal menyatakan bahwa pada jantung tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik, peningkatan sintesis BNP-45 menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah, diuresis, natriuresis dan menurunkan aktivitas sistem renin angiotensin aldosteron dan sistem saraf simpatik sehingga tekanan darah dan beban ventrikel jantung menurun. Respon tersebut bertujuan untuk membantu jantung mengurangi beban dan mempertahankan perfusi jaringan.¹⁶

Berdasarkan latar belakang tersebut, timbul pertanyaan penelitian apakah peningkatan ekspresi HIF-1 α berhubungan dengan ekspresi Mb dan BNP-45 serta mekanisme adaptasi molekul HIF-1 α terhadap induksi hipoksia hipobarik intermiten pada jantung tikus. Oleh karena itu, penelitian yang dilakukan akan mengukur ekspresi protein HIF-1 α sebagai penanda keadaan hipoksia. Mengukur ekspresi Mb dalam tingkat mRNA dan protein serta mengukur ekspresi mRNA BNP-45 sebagai penanda terjadinya peningkatan beban jantung tikus.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka perumusan masalah untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kadar protein HIF-1 α pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten?
2. Bagaimana ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten?
3. Bagaimana ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten?

4. Bagaimana hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten?
5. Bagaimana hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten?

1.3. Hipotesis Penelitian

1. Kadar protein HIF-1 α pada jantung tikus meningkat pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
2. Ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus meningkat pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
3. Ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus meningkat pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
4. Terdapat hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
5. Terdapat hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Menganalisis ekspresi HIF-1 α , Mb dan BNP-45 pada jantung tikus sebagai respons adaptasi pada paparan hipoksia hipobarik intermiten.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis kadar protein HIF-1 α pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
2. Menganalisis ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
3. Menganalisis ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
4. Mengetahui hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA dan kadar protein Mb pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten
5. Mengetahui hubungan antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA BNP-45 pada jantung tikus pada paparan hipoksia hipobarik intermiten

1.5. Manfaat Penelitian

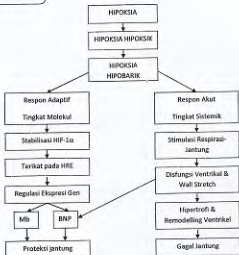
Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam:

1. Membantu memahami fenomena *hypoxia preconditioning* melalui penelitian ini.
2. Menambah pengetahuan mengenai respon adaptasi jantung pada paparan hipoksia hipobarik intermiten.

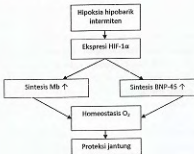
1.6. Kerangka Teori

Keterangan:

→ menginduksi



1.7. Kerangka Konsep



Keterangan:

→ menginduksi

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Oksigen

Pada temperatur dan tekanan yang standar, atom oksigen berikatan membentuk molekul O_2 diatomik (dioksigen). Oksigen diatomik tidak berwarna dan tidak berbau. Oksigen merupakan elemen ketiga terbanyak di alam semesta setelah hidrogen dan helium. Kadar oksigen diatomik adalah 20,95%. Oksigen memiliki peran vital bagi fisiologi tubuh. Dalam proses fosforilasi oksidatif, oksigen berperan sebagai akseptor elektron dalam mitokondria yang berperan dalam pembentukan adenosa trifosfat (ATP).¹⁸

Di dalam darah, oksigen ditransportasikan dalam dua bentuk yaitu 1,5% oksigen terlarut dalam plasma darah yang menggambarkan tekanan parsial oksigen dalam darah pO_2 dan 98,5% berikatan dengan hemoglobin yang disebut oksihemoglobin. Oksigen kemudian dilepaskan ke dalam sel jaringan melalui pembuluh darah kapiler.²

2.2. Penginderaan Oksigen (*Oxygen Sensing*)

Penginderaan oksigen (*oxygen sensing*) merupakan salah satu cara untuk mengetahui keberadaan oksigen di dalam darah. Turunnya kadar oksigen pertama kali dideteksi oleh *aortic body* dan *carotid body* berupa respon dalam bentuk hiperventilasi, peningkatan ekstraksi oksigen di paru, peningkatan curah jantung dan peningkatan perfusi ke jaringan. Pada tingkat organ, kondisi hipoksia dideteksi oleh sensor tingkat molekul intraseluler berupa respon dalam bentuk peningkatan vaskularisasi dan produksi sel darah merah.¹⁹ Penginderaan oksigen pada tingkat sel secara sederhana melibatkan hemoprotein. Hemoprotein merupakan protein yang mengandung Fe pada gugus heme sehingga mampu mengikat oksigen, contohnya hemoglobin dan mioglobin. Hipoksia dapat dideteksi dari reaksi perubahan pengikatan oksigen pada gugus heme yang menyebabkan penggeseran alosterik secara reversibel dari bentuk oksidasi (*oxy form*), yaitu bentuk ketika hemoprotein berikatan dengan oksigen, menjadi bentuk deoksi (*deoxy form*), yaitu bentuk ketika hemoprotein tidak berikatan dengan oksigen. Apabila

hemoprotein banyak ditemukan dalam bentuk deoksi di dalam darah, maka kondisi ini merupakan salah satu sinyal bahwa jumlah oksigen yang ada di dalam darah sedikit.²⁰

Jika ketiga jenis respon ini tidak dapat mengatasi kondisi hipoksia, diperlukan respon yang dikendalikan pada tingkat gen yang disebut *hypoxia preconditioning*. *Hypoxia preconditioning* adalah suatu periode subletal dari kondisi hipoksia yang dapat melindungi sel dari kejadian hipoksia selanjutnya. Penelitian sebelumnya pada mencit dewasa memperlihatkan bahwa toleransi tubuh terhadap kondisi hipoksia meningkat secara signifikan jika kondisi hipoksia dipaparkan secara akut dan intermiten.²¹

2.3. Hipoksia

Hipoksia merupakan suatu keadaan ketidakcukupan pasokan oksigen ke dalam sel atau jaringan tubuh yang dapat mengancam kelangsungan hidup organisme.² Kondisi hipoksia menyebabkan sel atau jaringan mengalami penurunan proses fosforilasi oksidatif untuk menghasilkan energi karena kekurangan oksigen.

Kondisi hipoksia dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis. Hipoksia fisiologis terjadi pada makhluk hidup yang tinggal di dataran tinggi dengan tekanan parsial oksigen yang rendah. Dalam kondisi lingkungan tersebut, makhluk hidup yang bersangkutan telah beradaptasi atau menyesuaikan diri. Dalam keadaan patologis, hipoksia dapat terjadi secara akut maupun kronik. Hipoksia akut merupakan suatu keadaan yang disertai penurunan kadar oksigen secara tiba-tiba pada tingkat jaringan, misalnya obstruksi pada jalan nafas, infeksi pada paru-paru dan kegagalan tiba-tiba pada sistem kardiovaskular. Hipoksia kronik merupakan suatu keadaan dengan penurunan kadar oksigen secara perlahan-lahan pada tingkat organ, yang dapat menyebar ke seluruh organ tubuh (sistemik), misalnya pneumonia dan anemia.⁴

Kondisi hipoksia dapat menyebabkan cedera atau kematian sel. Untuk mencegah hal tersebut, sel memiliki mekanisme respon fisiologi terhadap kondisi hipoksia melalui peningkatan kadar protein *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1).²²

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

Wang dkk menyebutkan bahwa protein HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari sub unit α (HIF-1 α) dan sub unit β (HIF-1 β). Hanya protein HIF-1 α yang

diinduksi secara khusus sebagai respon adaptasi sel terhadap kondisi hipoksia karena aktivasinya dipengaruhi oleh kadar oksigen. Protein HIF-1 α juga diketahui sebagai *master switch* gen pada kondisi *hypoxia preconditioning*. Protein HIF-1 α terdiri dari domain *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) yang berfungsi untuk pengikatan pada DNA, domain *Per-ARNT-Sim* (PAS) yang berfungsi untuk dimerisasi gen target, domain *Oxygen-Dependent Degradation* (ODD) yang berfungsi untuk degradasi oleh ubiquitin-proteasom dan domain *Transactivation* (TAD) yang berfungsi untuk pengikatan koaktivator transkripsi (CBP/p300).⁴¹

Jumlah protein HIF-1 yang terdapat di sitoplasma diatur oleh enzim *prolyl hydroxylase* (PHD) yang berfungsi sebagai sensor oksigen. PHD adalah suatu enzim yang aktivasinya diatur oleh ada atau tidaknya O₂ berfungsi sebagai substrat dan tergantung pada Fe²⁺ berfungsi sebagai kofaktor. Pada kondisi normoksia, PHD akan mengkatalisis hidroksilasi residu prolin 402 dan 564 pada domain ODD protein HIF-1 α sehingga protein *von Hippel Lindau* (vHL) dapat mengenali dan berikatan pada domain ODD protein HIF-1 α , sehingga protein HIF-1 α akan terdegradasi karena proses ubiquitinasi.⁴²

Pada kondisi hipoksia, PHD tidak dapat mengkatalisis hidroksilasi residu prolin pada protein HIF-1 α karena kurangnya substrat oksigen sehingga protein HIF-1 α tidak terdegradasi dan tidak dapat menjalankan fungsinya sebagai faktor transkripsi yang mengatur beberapa gen pada kondisi hipoksia.⁴² Mekanisme terjadinya transkripsi oleh protein HIF-1 α pada kondisi hipoksia dimulai dengan translokasi protein HIF-1 α dari sitoplasma ke dalam inti sel. Di dalam inti sel, domain TAD protein HIF-1 α akan berikatan dengan koaktivator transkripsi (CBP/p300) kemudian akan berheterodimerisasi dengan HIF-1 β . Domain bHLH heterodimer protein (HIF-1 α /HIF-1 β) akan berikatan dengan *Hypoxia Response Element* (HRE) di daerah promotor gen target yang akan menginduksi transkripsi gen target. HRE merupakan sekuens DNA 5'-RCGTG-3' yang terletak di hulu gen target.⁴³

Gen-gen yang diregulasi oleh HIF-1 α diantaranya *erythropoietin* (Epo), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *glucose transport* (GLUT) dan enzim-enzim jalur

glikolisis anaerob.⁹ HIF-1 α juga meningkatkan regulasi ekspresi gen pada metabolisme besi, termasuk feroksidase, reseptor transferin dan transferin yang berperan penting dalam pembentukan protein miooglobin.²³

2.5. Hipoksia pada Ketinggian (Hipoksia Hipobarik)

Hipoksia hipobarik merupakan kondisi hipoksia yang disebabkan oleh rendahnya tekanan oksigen pada ketinggian sehingga menyebabkan gangguan mekanisme oksigensi pada para-para. Menurut regulator penerbangan sipil di Amerika Serikat, *Federal Aviation Administration* (FAA), hipoksia hipobarik merupakan suatu kondisi kekurangan oksigen untuk memenuhi kebutuhan tubuh yang menyebabkan fungsi otak dan organ lain terganggu seperti gangguan pada penglihatan, kontrol motorik dan pengambilan keputusan bahkan juga dapat menyebabkan kematian. Efek hipoksia muncul setelah mencapai ketinggian 10.000 kaki / 3.048 m.²⁴

Dalam buku panduan Angkatan Udara Amerika Serikat (*US Airforce/USAF*) disebutkan bahwa semakin besar ketinggian di atas permukaan laut, semakin sedikit molekul oksigen yang dapat dihirup, semakin cepat juga seseorang tersebut kehilangan kesadaran (*loss of consciousness*) yang dinamakan waktu sadar efektif (*Time of Useful of Consciousness : TUC*). Waktu sadar efektif / TUC terdapat pada Tabel 2.1.²⁵

Tabel 2.1. Waktu sadar efektif (TUC)²⁵

Ketinggian (kaki)	Saturasi oksigen (%)	Waktu sadar efektif <i>Time of Useful of Consciousness</i>
18.000	80 s/d 70	20-30 menit
25.000	< 60	3-5 menit
30.000	< 60	1-2 menit
35.000	< 60	0,5-1 menit

2.6. Hypobaric Chamber Training²⁶

Tekanan hipobarik dapat menyebabkan risiko dekompresi dan hipoksia. Oleh karena itu dikembangkan *hypobaric chamber* untuk menahan pengalaman, pemahaman dan pelatihan kepada penerbang terhadap risiko paparan tekanan hipobarik.

2.6.1. Hypobaric Chamber Training di Lakespra Saryanto TNI AU

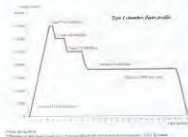
TNI Angkatan Udara selalu membuat program pelatihan indoktrinasi Latihan Aerofisiologi (ILA) berupa pengalaman pelatihan kepada penerbang terhadap resiko paparan tekanan hipobarik.

2.6.1.1. ILA Awal

Prosedur ILA awal diberikan kepada calon penerbang untuk pertama kalinya.

2.6.1.1.1. Chamber Flight Profile Tipe 1

Dengan kecepatan 5.000 kaki / menit menuju ke ketinggian 35.000 kaki dan dilakukan demonstrasi hipoksia akut pada 35.000 kaki, turun ke ketinggian 30.000 kaki dan dilakukan demonstrasi hipoksia akut pada 30.000 kaki, turun ke ketinggian 25.000 kaki dan dilakukan demonstrasi hipoksia pada 25.000 kaki selama 5 menit. Kemudian turun ke ketinggian 18.000 kaki dan dilakukan *night vision training* / latihan adaptasi penglihatan malam dengan lampu gelap.



Gambar 2.1. Chamber Flight Profile Tipe 1

2.6.1.1.2. *Rapid Decompression Profile*

Prosedur pelatihan untuk memberi pengenalan kepada penerbang adanya risiko *rapid decompression* / dekompresi cepat. Dengan kecepatan 5.000 kaki / menit menuju ke ketinggian 30.000 kaki, turun ke ketinggian 22.000 kaki, kemudian turun ke zona aman.

2.6.1.2. ILA Penyebaran

Prosedur ILA penyebaran diberikan kepada penerbang aktif, tergantung dari jenis penerbangnya.

2.6.1.2.1. *Chamber Flight Profile Tipe II (untuk penerbang tempur)*

Dengan kecepatan 5.000 kaki / menit menuju ke ketinggian 43.000 kaki kemudian turun ke zona aman dengan terus menggunakan masker oksigen 100%.

2.6.1.2.2. *Chamber Flight Profile Tipe II (untuk penerbang angkut)*

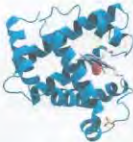
Dengan kecepatan 5.000 kaki / menit menuju ke ketinggian 35.000 kaki, turun ke ketinggian 25.000 kaki dan dilakukan demonstrasi hipoksia pada 25.000 kaki selama 5 menit. Kemudian turun ke ketinggian 18.000 kaki dan dilakukan *night vision training* / latihan adaptasi penglihatan malam dengan lampu gelap.

2.7. Mioglobin (Mb)

Mioglobin merupakan protein pengikat oksigen yang banyak terdapat di jantung dan otot rangka vertebrata. Orang atau hewan yang tinggal di daerah dataran tinggi mempunyai kadar mioglobin yang tinggi.¹⁵

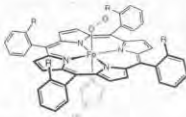
2.7.1. Struktur Mioglobin

Mioglobin adalah protein globuler dengan berat molekul 16.700 kDa.²⁶ Struktur mioglobin merupakan rantai polipeptida tunggal (*monomeric hemoprotein*) yang terdiri dari 153 residu asam amino dan gugus heme yang terbentuk dari cincin ferfirin-besi. Rantai polipeptida mioglobin mengalami lipatan membentuk struktur tertier yang tersusun dari 8 heliks α dan membentuk kerangka struktural yang kaku untuk menyediakan tempat bagi gugus heme, yang digabungkan oleh daerah non heliks.²⁷



Gambar 2.2. Struktur tertier mioglobin²⁸

Gugus heme mioglobin mempunyai 4 cincin heterosiklik pirol yang digabungkan oleh jembatan metilena dan terletak diantara dua residu histidin pada posisi 64 (His64) dan 93 (His93). Ion besi berinteraksi dengan enam ligan, empat diantaranya disediakan oleh atom nitrogen. Sisi rantai imidazol his93 menyediakan ligan kelima yang menstabilkan gugus heme. Pada ligan keenam yang tidak terdapat ikatan apapun merupakan tempat bagi situs pengikatan oksigen.²⁷



Gambar 2.3. Situs pengikatan oksigen pada mioglobin²⁰

Bagian permukaan mioglobin bersifat hidrofilik sedangkan bagian dalam bersifat hidrofobik. Bagian hidrofobik akan melindungi gugus heme dari interaksi van der Waals yang dapat terjadi dalam sitoplasma, hal ini menyebabkan ion besi yang terdapat dalam protein mioglobin stabil dan tidak mudah teroksidasi.²¹

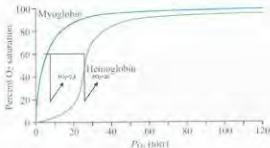
2.7.2. Lokasi dan Ekspresi Mioglobin

Penelitian yang dilakukan pada tikus (*Chelonia mydas*) menunjukan bahwa mioglobin secara umum ditemukan di otot rangka dan jantung. Keberadaan mioglobin merupakan respon terhadap meningkatnya kebutuhan oksigen untuk menghasilkan energi selama respirasi sel.¹⁷

Mekanisme ekspresi mioglobin yang diinduksi oleh hipoksia dimulai dengan pembentukan protein *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) di dalam sitoplasma yang akan berheterodimerisasi dengan HIF-1 β . Heterodimer ini akan bertranslokasi ke dalam nukleus kemudian berikatan dengan protein koaktivator transkripsi (CRP/p300) yang berperan dalam aktivasi transkripsi dan berikatan pada HRE (*Hypoxia Response Element*) di daerah promotor gen yang berperan dalam pembentukan reseptor transferin, transferin, dan peroksidase. Senyawa tersebut berperan dalam mengikat dan menstabilkan besi (Fe) pada gugus heme protein mioglobin.^{20,23}

2.7.3. Fungsi Mioglobin

Protein mioglobin mempunyai afinitas lebih tinggi terhadap oksigen dibandingkan dengan protein hemoglobin. Hal tersebut dapat dilihat pada kurva saturasi oksigen mioglobin dan hemoglobin. Kurva mioglobin memperlihatkan bentuk hiperbolik sedangkan kurva hemoglobin memperlihatkan bentuk sigmoid.²⁶



Gambar 2.4. Kurva saturasi oksigen pada mioglobin dan hemoglobin²⁶

Pada kurva tersebut, mioglobin sudah mencapai 50% jenuh terhadap oksigen pada tekanan 2.8 mmHg. Sedangkan hemoglobin melepaskan oksigen pada tekanan 26 mmHg. Hal tersebut menunjukkan bahwa mioglobin memiliki afinitas lebih tinggi terhadap oksigen dibandingkan dengan hemoglobin.²⁶ Tingginya afinitas mioglobin terhadap oksigen menjadi dasar pemikiran bahwa mioglobin berfungsi sebagai hemoprotein penyimpan oksigen. Fungsi ini terutama terdapat pada mamalia laut yang melakukan aktivitas menyelam, seperti pada tukik (*Chelonia mydas*).¹⁵

Mioglobin juga berfungsi memfasilitasi difusi oksigen dari membran sel ke mitokondria. Proses difusi oksigen memerlukan keberadaan mioglobin yang

terdeoksigenasi dalam tekanan parsial oksigen yang rendah, gradien konsentrasi mioglobin yang terdeoksigenasi berfungsi sebagai kekuatan pendorong agar difusi dapat berlangsung.³¹

Saat tekanan parsial oksigen di jaringan tinggi, mioglobin akan menyimpan oksigen di sarkolema. Sedangkan saat tekanan parsial oksigen di jaringan rendah, mioglobin masih dapat menyalurkan oksigen ke mitokondria. Oleh karena itu, mioglobin berperan penting dalam menjaga homeostasis oksigen.³⁰

Pada kondisi hipoksia, sel melakukan mekanisme adaptasi untuk mengurangi ketergantungan terhadap oksigen dengan cara membagikan ekspresi protein globin dalam jaringan. Peningkatan kadar protein globin dalam jaringan akan meningkatkan tekanan parsial oksigen dalam jaringan yang berespons pada peningkatan afinitas protein globin terhadap oksigen.³²

Fungsi mioglobin lainnya yaitu sebagai *scavenger Nitrogen Oksida (NO)*. NO adalah gas yang terdiri dari satu atom nitrogen dan satu atom oksigen yang diproduksi oleh sel endotel. Produksi NO akan meningkat selama inflamasi, sehingga apabila produksinya tidak terkendali akan menimbulkan kerusakan pada sel atau jaringan karena bersifat radikal bebas. Oleh karena itu, produksi NO yang berlebih perlu ditasi dengan cara berikatan dengan mioglobin. Dalam hal ini mioglobin bertindak sebagai nitrat reduktase. NO akan dioksidasi melalui bentuk pengikatan $Mb(Fe^{2+})O_2$ yang akan menghasilkan $Mb(Fe^{3+})$ / metMb dan NO_2^- .³³

Mioglobin juga berperan penting dalam menjaga homeostasis NO pada jantung. Saat jantung mengalami hipoksia, jumlah NO di sinusot miomit berlebih. Degradasi NO di sinusot miomit dilakukan dengan pengikatan MbO_2 sebagai nitrat reduktase untuk menghasilkan metMb dan NO_2^- . Berdasarkan fungsinya tersebut, mioglobin berperan penting untuk menjaga aliran darah vaskuler, kontraksi jantung dan mencegah infark otot jantung.³⁴

2.8. *Natriuretic Peptide (NP)*

Natriuretic Peptide merupakan sistem endokrin yang mempertahankan homeostatis cairan dan tekanan melalui fungsi jantung dan ginjal. Struktur dasar NP adalah 1 cincin dengan 2 ekor. Bioaktivitas NP berada dalam struktur cincinnya.¹¹

2.8.1. *A-type Natriuretic Peptide (ANP)*¹²

Pada tahun 1984 ditemukan hormon pada jantung yang memiliki fungsi endokrin dan natriuretik. Hormon tersebut disekresikan ke atrium kiri jantung dan diberi nama *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP). Pada manusia, ANP merupakan polipeptida yang memiliki 17 residu asam amino pada struktur cincinnya, di dalam sirkulasi ANP memiliki 28 residu asam amino. Reseptor ANP adalah NPR-A yang banyak terdapat pada pembuluh darah besar.

2.8.2. *B-type Natriuretic Peptide (BNP)*¹³

B-type Natriuretic Peptide (BNP) merupakan peptida natriuretik yang berasal dari membran granula pada ventrikel jantung yang berperan penting dalam regulasi volume cairan ekstraseluler dan tekanan darah. Peptida ini mempengaruhi vasodilatasi pembuluh darah, diuresis, natriuresis dan menurunkan aktivitas sistem renin angiotensin aldosteron dan sistem saraf simpatik sehingga tekanan darah dan beban ventrikel jantung menurun.

Pada awalnya BNP ditemukan di otak babi dan diberi nama peptida natriuretik otak (*brain natriuretic peptide*). Selain di otak, molekul BNP lebih banyak ditemukan di jantung. Saat terjadi peningkatan ketegangan pada dinding otot jantung akibat beban volume dan tekanan berlebih, seperti pada hipertensi dan gagal jantung, kardiomiosit pada ventrikel kiri jantung mensekresikan molekul BNP. Selain ketegangan pada dinding ventrikel otot jantung, kardiomiosit juga dapat distimulasi oleh norepinefrin, endothelin-1, glukokortikoid, sitokin proinflamasi dan iskemia.

BNP disintesis oleh miokardium sebagai hormon yang tidak aktif, disebut pro-BNP. Untuk menjadi hormon yang aktif, pro-BNP dipecah di darah menjadi N-terminal BNP (N-BNP) yang tidak aktif dan BNP yang aktif. Pada manusia, BNP merupakan polipeptida yang memiliki 17 residu asam amino pada struktur cincinnya, di dalam sirkulasi BNP memiliki 32 residu asam amino. Reseptor BNP adalah NPR-B yang terdapat pada ginjal. Ikatan NP dengan reseptornya akan mengaktifkan protein-G, menghasilkan *second messenger* dan memicu peningkatan siklus guanosine monophosphate (cGMP). Efek dan BNP terdapat pada Tabel 2.2.¹²

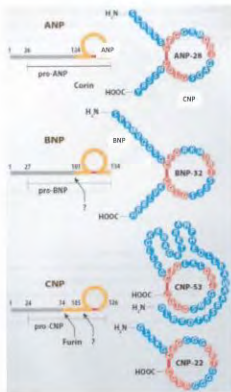
BNP memiliki waktu paruh 12-22 menit. N-BNP dan BNP dalam sirkulasi darah dapat dijadikan sebagai marker untuk diagnosis dan prognosis gagal jantung. Gagal jantung merupakan suatu keadaan penyakit dimana jantung tidak mampu memompa cukup darah untuk memenuhi kebutuhan jaringan dalam menjalankan fungsi jantung secara normal. Symat biomarker adalah prosedur pemeriksaannya mudah dilaksanakan, murah, memiliki sensitivitas yang tinggi dan stabil. Dalam uji diagnostik, jika kadar BNP < 100 pg/ml dianggap memiliki resiko negatif gagal jantung dan jika kadar BNP > 100 pg/ml dianggap memiliki resiko positif gagal jantung.

Tabel 2.2. Efek BNP pada ginjal, kelenjar adrenal dan jantung¹⁰

Organ	Efek BNP
Ginjal	Inhibisi produksi renin dan reabsorpsi natrium
Kelenjar adrenal	Melepaskan inhibisi aldosteron
Jantung	Menurunkan aktivitas sistem saraf simpatis

2.8.3. C-type Natriuretic Peptide (CNP)²²

CNP terdapat di otak, ginjal dan sel endotel pembuluh darah. Pada manusia, CNP merupakan polipeptida yang memiliki 17 residu asam amino pada struktur cincinnya, di dalam sirkulasi CNP memiliki 22 residu asam amino. Struktur biokimia ketiga peptida natriuretik terdapat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur biokimia dari ANP, BNP dan CNP¹⁰

2.8.4. D-type Natriuretic Peptide (DNP)²⁴

Pada awalnya DNP ditemukan di ular monbu hijau (*dendroaspis angusticeps*) dan diberi nama *dendroaspis natriuretic peptide (DNP)*. Pada manusia, DNP merupakan polipeptida yang memiliki 17 residu asam amino pada struktur cincunya, di dalam sirkulasi DNP memiliki 38 residu asam amino.



Gambar 2.6. Struktur blokinta dari DNP²⁴

2.8.5. Urodilatin²⁵

Urodilatin disintesis dan disekresikan dari tubulus distal ginjal, bertindak sebagai mediator parakrin ketika disekresikan ke dalam lumen ginjal. Pada manusia, urodilatin merupakan polipeptida yang memiliki 17 residu asam amino pada struktur cincunya, di dalam sirkulasi urodilatin memiliki 32 residu asam amino. Urodilatin memiliki struktur yang identik dengan ANP kecuali perpanjangan dari empat asam amino tambahan pada N-terminasi (treonin, alanin, prolin, dan arginin).



Gambar 2.7. Struktur blok kimia dari urodilatin³⁸

2.9. Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Tikus merupakan mamalia dari ordo Rodentia dan famili Muridae. Tikus putih (*rattus norvegicus*) memiliki kemudahan dalam pemeliharaan dan memiliki kemampuan adaptasi yang baik sehingga banyak digunakan sebagai hewan percobaan dalam penelitian. Tikus putih juga memiliki organ yang sama seperti manusia, yang berperan dalam menjaga homeostasis tubuh.³⁶

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), menganalisis hubungan faktor hipoksia (variabel bebas) terhadap respon kadar protein HIF-1 α , ekspresi mRNA dan kadar protein Mb, serta ekspresi mRNA BNP-45 (variabel terikat) pada jaringan jantung tikus yang mengalami hipoksia hipobarik. Hasilnya kemudian dibandingkan dengan jaringan jantung tikus normal.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Induksi hipoksia dilaksanakan di Lakespa Suryanto TNE AU Jakarta. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung sejak bulan Februari 2015 sampai bulan Februari 2016.

3.3. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel dari jaringan jantung tikus *Spregue-Dawley* yang mengalami hipoksia hipobarik intermiten dan jaringan jantung tikus *Spregue-Dawley* normal. Terdapat 5 kelompok sampel yang diteliti, yaitu: 1) kelompok kontrol normal, 2) tikus yang diinduksi 1 kali prosedur *hypobaric chamber training* (pada hari 1), 3) tikus yang diinduksi 2 kali prosedur *hypobaric chamber training* (pada hari 1 dan 8), 4) tikus yang diinduksi 3 kali prosedur *hypobaric chamber training* (pada hari 1, 8 dan 15), 5) tikus yang diinduksi 4 kali prosedur *hypobaric chamber training* (pada hari 1, 8, 15 dan 22). Semua tikus euthanasia dengan dekaptasi kemudian diambil organ jantungnya.

3.4. Jumlah Ulangan Tiap Variabel Bebas

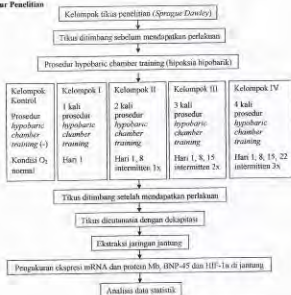
Penetapan jumlah sampel penelitian berdasarkan rumus Federer ($n-1 \geq 15$), dengan t adalah jumlah kelompok, dan n adalah jumlah pengulangan untuk setiap kelompok, didapatkan nilai $n \geq 4$. Maka dalam penelitian ini jumlah sampel ditetapkan

untuk setiap kelompok adalah 5, dan jumlah total tikus yang diinduksi keadaan hipoksia adalah 20 ekor, dan total tikus sebagai kontrol adalah 5 ekor.

3.5. Izin Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel dari jaringan jantung tikus yang diinduksi hipoksia dengan beberapa variasi jumlah induksi (1, 2, 3 dan 4 kali). Oleh karena menggunakan hewan coba, maka perlu ada perizinan dari komisi etik. Penelitian ini telah mendapatkan keterangan lolos kaji etik (*ethical approval*) dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI/RSCM dengan nomor 45/UNZ.F1/ETIK/1/2016.

3.6. Alur Penelitian



3.7. Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu:

3.7.1.1. Bahan untuk Induksi Hipoksia Tikas: oksigen (O_2), bahan makanan dan minuman tikus.

3.7.1.2. Reagensia untuk Pemeriksaan Ekspresi mRNA Mb, BNP-45 dan 18S rRNA: Reagensia yang digunakan untuk isolasi RNA total adalah *total RNA mini kit (RNeasy)* (Qiagen) yang terdiri atas *RL buffer*, *WI buffer*, *wash buffer* (mengandung etanol) dan sir bebas dari nuklease. *KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit* (KAPA Biosystems) adalah kit untuk *real time* RT-PCR satu langkah yang terdiri atas *SYBR Green* dan enzim transkriptase balik. Selain itu komponen lainnya adalah *primer maju (forward)* dan *primer balik (reverse)* (IDT-DNA Technologies), RNA cetakan (dari syringan jantung tikus).

3.7.1.3. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein HIF-1 α : Pembuatan homogenat menggunakan PBS 0,01 M, pH 7,4. Kadar protein HIF-1 α diperiksa dengan menggunakan *Rat hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α ELISA kit 96T* (Eitestscience) yang terdiri atas standar protein HIF-1 α , antibodi anti HIF-1 α berlabel biotin, HRP-avidin, dapat pencuci, diluen, substrat TMB dan larutan penyetop.

3.7.1.4. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein Mb: Pembuatan homogenat menggunakan PBS 0,01 M, pH 7,4. Kadar protein Mb diperiksa dengan menggunakan *Rat myoglobin, MYO ELISA kit 96T* (Eitestscience) yang terdiri atas standar protein Mb, antibodi anti Mb berlabel biotin, HRP-avidin, dapat pencuci, diluen, substrat TMB dan larutan penyetop.

3.7.1.5. Reagensia untuk Pemeriksaan Kadar Protein Total : *Bovine serum albumin (BSA)* (Santa Cruz) dan aquabides.

3.7.1.6. Bahan Habis Pakai : tabung mikro (ukuran 1,5 ml., Extragene), tabung PCR (ukuran 0,2 ml., Bioneer), tisu, aluminium foil, sarung tangan non powder, masker dan *tips* (*white, yellow dan blue tips*).

3.7.2. Alat Penelitian

Ruang hipoksia hipobarik (*hypoxia hypobaric chamber*), alat bedah minor, *ultra low temperature freezer* -80°C (MDF-U3286S, Sanyo), timbangan analitik digital (HT225S, Sartorius), sterilisator, autoklaf, verteks (Fortune), *microcentrifuge*, *homogenizer* (Tokyo Rikakikai Co. Ltd), pipet multigrade (Bio-Rad), labung fluorimetri (Pyrex), penangas suhu 37°C (K6 8540 Schwabach), sensuslogator (Universal 32R (Hettich zentrifugen), spektrofotometer Genesys 10 uv scanning (Thermo Scientific), *quantitative Real Time RT-PCR* (ExicyclerTM 96, Bioneer Laboratories-Korea), perangkat lunak Bioneer Exicycler Manager, spektrofotometer Varoskan Flash (Thermo Scientific).

3.8. Cara Kerja

3.8.1. Persiapan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel

3.8.1.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley berusia 8-12 minggu dengan berat badan berkisar 150-250 g. Tikus ini diperoleh dari Laboratorium Badan Pengawas Obat dan Makanan, Kementerian Kesehatan RI. Sebelum diinduksi hipoksia, 25 ekor tikus diadaptasikan dengan kondisi lingkungan di ruang binatang Lakespra Sarymito TNI AU Jakarta selama 1 minggu. Suhu ruangan dijaga pada 25°C, makanan diberikan secara *ad libitum*, serta tetap ada pertukaran gelap-terang setiap 12 jam. Kemudian tikus dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok (kontrol, hipoksia hipobarik, hipoksia hipobarik intermiten 1 kali, hipoksia hipobarik intermiten 2 kali, hipoksia hipobarik intermiten 3 kali), masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus.

3.8.1.2. Induksi Hipoksia Hipobarik

Sebelum diberi perlakuan hipoksia, berat badan tikus ditimbang satu per satu setiap kelompok. Induksi hipoksia dilakukan dengan menempatkan tikus dalam ruang hipoksia hipobarik (*hypoxia hypobaric chamber*). Ruang ini dibuat sedemikian rupa dengan pengaturan kadar gas O_2 dan tekanan. Induksi hipoksia tikus dilakukan secara bertahap. Setelah induksi hipoksia sesuai dengan kelompoknya, berat badan tikus ditimbang kembali. Kemudian tikus segera di euthanasia dengan cara dekapsitasi (pemisahan kepala dengan tulang leher).

3.8.1.3. Pengambilan Jaringan Jantung Tikus

Setelah dilakukan dekapsitasi, kemudian dilakukan pembedahan. Organ jantung diambil dan ditimbang, kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1 mL steril yang telah dilabel, kemudian disimpan dalam lemari ultra dingin dengan suhu $-80^{\circ}C$.

3.8.2. Isolasi Protein Total Jaringan Jantung

3.8.2.1. Pembuatan Homogenat Jantung

Jaringan jantung ditimbang 100 mg, dihomogenisasi dengan penambahan 1 mL larutan PBS 0,01 M dan pH 7,4 menggunakan homogenizer pada kondisi dingin. Untuk memecah sel, pada homogenat dilakukan *freeze-thaw cycles*. Setelah lumpur dan busung, homogenat disentrifugasi pada 5000xg selama 5 menit pada suhu $4^{\circ}C$. Supernatan dipisahkan dan disimpan pada lemari dingin $-20^{\circ}C$ untuk pengukuran kadar protein total.

3.8.2.2. Pengukuran Kadar Protein Total Jaringan Jantung

Kadar protein total jaringan jantung diukur dengan menggunakan metode Warburg-Christian dengan larutan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar protein. Larutan standar BSA dibuat dengan satu seri pengenceran konsentrasi yaitu 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1 mg/mL dengan volume 1 mL.

Tabel 3.1. Prosedur kerja pembuatan kurva standar BSA

Larutan	Konsentrasi larutan standar BSA (mg/ml)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	1
Larutan BSA (μ L)	0	100	200	400	600	1000
Aquabides (μ L)	1000	900	800	600	200	0

Absorbansi dibaca pada λ 280 nm

Pengukuran kadar protein total jaringan jantung tikus menggunakan spektrofotometri dengan pengenceran 1:50 dalam volume 1000 μ L.

Tabel 3.2. Prosedur pengukuran kadar protein total jantung tikus

Tabung (duplo)	Kontrol	HH 1x	HH 2x	HH 3x	HH 4x
Supernatan jantung (μ L)	100	200	400	600	1000
Aquabides (μ L)	900	800	600	200	0

Absorbansi dibaca pada λ 280 nm

3.8.3. Isolasi RNA Total Jaringan Jantung

Isolasi RNA total jaringan jantung dilakukan menggunakan Total RNA Mini Kit (tissue) (Geneaid) yang terdiri dari 5 tahap

3.8.3.1. Tahap 1: Persiapan Sampel

Jaringan jantung ditimbang 25 mg, dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL.

3.8.3.2. Tahap 2: Lisis Sel

400 μ L RLT buffer dan 4 μ L β -merkaptoetanol ditambahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Jaringan dihancurkan menggunakan mikropesle yang tersedia, dihomogenisasi menggunakan senpat 20 G sebanyak 10 kali, dikubasi pada suhu ruang selama 3 menit. Filter Column diletakkan pada 2 mL Collection Tube. Homogenat dipindahkan ke dalam Filter Column, disentrifugasi pada 10000g selama 30 detik, Filter Column dibuang. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL.

3.8.3.3. Tahap 3: Pengikatan RNA

400 μ L etanol 70 % ditambahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang berisi filtrat, dikocok dengan cepat. RB Column diletakkan pada 2 mL Collection Tube. Homogenat dipindahkan ke dalam RB Column, disentrifugasi pada 14-16000xg selama 1 menit, supernatan dibuang. RB Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube.

3.8.3.4. Tahap 4: Pencucian

400 μ L W1 buffer ditambahkan ke dalam RB Column, disentrifugasi pada 14-16000xg selama 30 detik, supernatan dibuang. RB Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube. 600 μ L buffer pencuci ditambahkan ke dalam RB Column, disentrifugasi pada 14-16000xg selama 30 detik, supernatan dibuang. RB Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube. 600 μ L wash buffer ditambahkan ke dalam RB Column, disentrifugasi pada 14-16000xg selama 30 detik, supernatan dibuang. RB Column diletakkan kembali pada 2 mL Collection Tube. Sentrifugasi pada 14-16000xg selama 3 menit.

3.8.3.5. Tahap 5: Elusi RNA

RB Column yang sudah kering diletakkan pada tabung mikro 1,5 mL. 50 μ L air bebas dari nuklease ditambahkan ke tengah RB Column. Dididihkan selama 2 menit untuk memastikan air bebas dari nuklease terserap pada matriks, disentrifugasi pada 14-16000xg selama 1 menit untuk mengelusi RNA murni.

3.8.3.6. Perhitungan Konsentrasi dan Kemurnian RNA Total

Tabung mikro yang berisi RNA dibaca serapannya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil isolasi RNA memiliki kemurnian yang baik jika indeks kemurniannya berada pada kisaran angka 1,7 – 2. Rumus untuk menentukan indeks kemurnian RNA yaitu:

$$\text{Indeks kemurnian RNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Rumus untuk menentukan konsentrasi RNA total yaitu:

$$\text{Konsentrasi RNA} = A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

3.8.3.7. Pengenceran Sampel RNA Total Hasil Isolasi Menjadi Larutan Induk RNA Cetakan

Konsentrasi RNA semua sampel yang didapatkan dari hasil penghitungan bervariasi. Kemudian konsentrasi RNA semua sampel disengamkan menjadi 100 ng/ μL sesuai dengan rumus pengenceran dan dijadikan sebagai larutan induk untuk pengukuran ekspresi mRNA beberapa gen. Hal ini bertujuan untuk memudahkan saat pengerjaan *Real Time RT-PCR*. Rumus untuk pembuatan larutan induk RNA 100 ng/ μL yaitu:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

3.8.4. Desain Primer

Primer yang didesain adalah untuk gen Mb dengan spesimen *ratitus norvegicus*, sedangkan primer BNP-45 dan 18S rRNA sebagai gen referensi digunakan dari penelitian sebelumnya.^{36,37} Alat yang digunakan adalah laptop dan koneksi internet. Perangkat lunak yang digunakan adalah <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dan <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/primeranalyzer>.

3.8.4.1. Karakteristik Primer

Beberapa karakteristik primer yang baik adalah sebagai berikut: disusun oleh 15 hingga 32 pasang basa; komposisi basa terdiri atas G+C content sekitar 20-80%; pada ujung 3' terdiri atas basa G dan C; hindari basa berulang seperti ATATATAT; ulangan basa maksimal 4 nukleotida; suhu lebur (T_m) sekitar 55-80°C; beda T_m pada pasangan primer sekitar 2-5°C; meminimalkan kemungkinan terbentuknya struktur sekunder dan dimer.

3.8.4.2. Desain dan Analisis Primer

Mencari urutan nukleotida primer dengan cara dibuka <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, dipilih *Gene*, dimasukkan kata kunci gen yang dicari,

contoh: *myoglobin ratna norvegicus*, salin nomor akses (*accession number*) dan sekuen FASTA gen yang dicari.

Untuk mencari desain primer yang tersedia, direkan *pick primer*, dimasukkan nomor akses atau sekuen FASTA, ditentukan ukuran produk PCR yang diinginkan (150-200), diatur nilai Tm (contoh: min 57 opt 60 max 63), primer harus berada diantara exon-exon, digunakan dasar data: RefSeq mRNA, organisme: *Rattus norvegicus*, direkan *get primer*, kemudian dipilih desain primer yang sesuai dengan karakter primer yang baik. Analisis struktur sekunder dan dimen pakai primer menggunakan perangkat lunak <http://eu.idna.com/analysis/applications/onlineanalysis/>.

Sebelum digunakan primer yang awalnya berbentuk serbuk harus dilarutkan terlebih dahulu dengan buffer TE, dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian diencerkan 10x.

3.8.5. Analisis Ekspresi mRNA Mb dan BNP-45 dengan Real Time RT-PCR

Satu Langkah

3.8.5.1. Optimasi Satu Annealing Primer

Tahap ini merupakan tahap awal sebelum dilakukan amplifikasi cDNA pada semua gen yang akan dianalisis ekspresinya. Berdasarkan data hasil analisis primer diperoleh suhu lebur (T_m) masing-masing primer, yaitu Mb primer maju 56,7°C dan primer balik 54,6°C; BNP-45 primer maju 57,7°C dan primer balik 59,8°C, dan 18S rRNA primer maju 57,02°C dan primer balik 58,06°C. Namun perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* masing-masing primer pada rentang suhu 53-63°C untuk memperoleh suhu *annealing* yang optimum. Prosedur pembuatan *master mix* terdapat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Prosedur pembuatan *master mix* dan cetakan RNA dalam satu tabung PCR

Reagen	Konsentrasi	Volume (μ L)
KAPA Sybr Fast qPCR Master Mix (2x)	1x	10
Primer forward	100 nM	0,4
Primer reverse	100 nM	0,4
KAPA RT Mix	1x	0,4
Cetakan RNA	100 ng	1
Air bebas dari nuklease (NFW)	Disesuaikan	7,8
Volume total		20

Protokol reaksi menggunakan *KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR kit* adalah sebagai berikut:

1. Aktivasi enzim transkriptase balik pada suhu 42°C selama 5 menit.
2. Inaktivasi enzim transkriptase balik pada suhu 95°C selama 5 menit.
3. Denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik.
4. *Annealing* primer pada gradien suhu 53-63°C selama 30 detik (Hasil pengaturannya dari mesin PCR dengan range 10: A. 53°C, B. 54,11°C, C. 55,22°C, D. 56,33°C, E. 57,44°C, F. 58,56°C, G. 59,67°C, H. 60,78°C, I. 61,89°C, J. 63°C).
5. Perpanjangan rantai DNA pada suhu 72°C selama 30 detik.
6. Pengulangan protokol reaksi dari tahap 3 sampai 5 hingga 40 siklus.
7. Analisis kurva titik leleh (*melting curve*) pada suhu 55°C selama 1 menit dan naik sebanyak 0,5°C selama 5 detik hingga mencapai suhu 95°C.
8. Pendinginan hingga suhu 20°C selama 5 menit.

3.8.5.2. Amplifikasi cDNA

Amplifikasi cDNA pada penelitian ini menggunakan Real Time RT-PCR satu langkah. Pembentukan ampikon DNA dideteksi saat proses amplifikasi berlangsung, karena pada reagen yang digunakan terdapat senyawa fluorosens. Senyawa fluorosens ini dapat mengikat DNA dan melabel primer. Fluoresensi yang terukur menggambarkan jumlah produk yang diamplifikasi di setiap siklus amplifikasi.²⁸ Penelitian ini menggunakan cetakan awal berupa RNA yang ditranskripsi balik menjadi cDNA oleh enzim transkriptase balik dan dilakukan dalam satu langkah dengan amplifikasi cDNA yang terbebas.

Penelitian ini menggunakan cetakan awal RNA dengan konsentrasi 100 ng/μL untuk gen 18S rRNA, 34b dan BNP-45. Prosedur pembuatan *mastex mix* dan cetakan RNA terdapat pada Tabel 3.3. Setiap sampel diisi dalam duplo dengan komposisi reaksi yang sama. Kontrol negatif yang digunakan adalah *non-template control* (NTC). NTC adalah kontrol negatif yang mengandung semua komposisi *mastex mix* tetapi tidak mengandung cetakan RNA sehingga volume NFW yang digunakan 8,5 μL. Berdasarkan

hasil optimasi suhu *annealing*, diperoleh suhu *annealing* optimum dari setiap gen yaitu 57,44°C untuk gen 18S rRNA, gen Mb, dan 60,78°C untuk gen BNP-45.

3.8.5.3. Analisis Ekspresi 18S rRNA, Mb dan BNP-45

Dari hasil amplifikasi cDNA dengan *Real Time RT-PCR* satu langkah diperoleh nilai *threshold cycle* atau Ct. Ekspresi gen dianalisis secara kuantitatif relatif menggunakan metode Livak. Mula-mula dilakukan normalisasi nilai Ct gen sasaran terhadap gen referensi sebagai nilai uji dan kalibrator, sehingga rasio ekspresi relatif gen dapat dihitung dengan persamaan 3.1. Kemudian nilai rasio sampel perlakuan dibandingkan dengan sampel kontrol, sehingga didapatkan kesimpulan ekspresi gen sasaran mengalami kenaikan atau penurunan.

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{(uji)} &= Ct_{(sasaran, uji)} - Ct_{(sasaran, kalibrator)} \\ \Delta Ct_{(kontrol)} &= Ct_{(sasaran, kalibrator)} - Ct_{(sasaran, kontrol)} \\ \Delta \Delta Ct &= \Delta Ct_{(uji)} - \Delta Ct_{(kontrol)} \\ \text{Rasio ekspresi relatif gen} &= 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad (3.1)\end{aligned}$$

3.8.6. Penentuan Kadar HIF-1 α dan Mb dengan Teknik ELISA^{94a}

Penelitian ini menggunakan *Rat HIF-1 α* (*Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha*) ELISA Kit 96T-Elabscience (Elabscience Cat. Number E-EL-R0513) dan *Rat MYO* (*Myoglobin*) ELISA Kit 96T-Elabscience (Elabscience Cat. Number E-EL-R0053). Metode ELISA yang digunakan menggunakan prinsip reaksi antibodi dengan antigen.

3.8.6.1. Pembuatan Homogenat Jaringan Jantung

Jaringan jantung ditimbang sebanyak 100 mg, dihomogenisasi dengan penambahan 1 mL PBS (0,01M, pH=7,4). Homogenat disimpan dalam lemari beku -20°C selama 24 jam, kemudian dikeluarkan dari lemari beku dan dilakukan siklus *freeze-thaw* sebanyak 2 kali untuk memecah membran sel. Homogenat disentrifugasi pada 5000xg selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk disimpan dalam tabung mikro 1,5 mL dan lemari beku -20°C.

3.8.6.2. Preparasi Reagen dan Sampel

Preparasi reagen dilakukan sesuai dengan petunjuk pada kit ELISA. Setiap akan dilakukan pemeriksaan protein, reagen perlu diencerkan terlebih dahulu sesuai dengan banyaknya kebutuhan. Reagen yang perlu diencerkan adalah sebagai berikut:

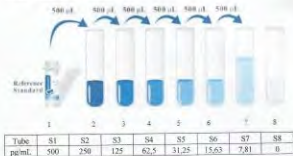
1. Dapur pencuci: perlu dilakukan pengenceran hingga 25 kali dari larutan induk dengan cara 1 mL larutan induk dapur pencuci diencerkan dengan penambahan 25 mL aquabides steril.
2. Antibodi berlabel biotin: perlu dilakukan pengenceran hingga 100 kali dari larutan induk dengan cara 1 mL larutan induk antibodi berlabel biotin diencerkan dengan penambahan 100 mL pelarut antibodi berlabel biotin.
3. Konjugat HRP: perlu dilakukan pengenceran hingga 100 kali dari larutan induk dengan cara 1 mL larutan induk konjugat HRP diencerkan dengan penambahan 100 mL pelarut konjugat HRP.

Sebelum dilakukan pengukuran terhadap seluruh sampel, terlebih dahulu dilakukan optimasi konsentrasi protein yang akan digunakan. Nilai absorbansi protein sampel harus berada pada kisaran nilai absorbansi standar yang tertinggi dan terendah. Sampel yang digunakan adalah supernatan janting tikus yang diencerkan dengan penambahan pelarut standar yang tersedia pada kit ELISA. Variasi pengenceran yang dilakukan yaitu sampel tanpa pengenceran, sampel dengan pengenceran 10x, 50x, 100x, 200x dan 400x. Pengenceran dengan serapan terbaik adalah pengenceran 500x untuk protein HIF-1 α dan pengenceran 5x untuk protein Mb.

3.8.6.3. Pembuatan Kurva Standar

Standar HIF-1 α dan Mb tersedia dalam bentuk bubuk. Sebelum digunakan, tabung standar disentrifugasi pada 10000xg selama 1 menit dan diencerkan dengan penambahan 1 mL pelarut standar. Kemudian larutan standar diinkubasi selama 10 menit. Larutan standar protein HIF-1 α memiliki konsentrasi 500 pg/mL dan merupakan standar tertinggi (S1). Larutan standar protein Mb memiliki konsentrasi 40 μ g/mL dan merupakan standar tertinggi (S1). Disiapkan 7 tabung mikro yang telah dilabeli (S2, S3, S4, S5, S6, S7 dan S8) dan diisi 500 μ L pelarut standar pada setiap tabung. Kemudian

dilakukan seri dilusi larutan standar, S1 merupakan standar tertinggi, S7 merupakan standar terendah dan S8 merupakan blanko.



Gambar 3.1. Seri dilusi larutan standar HIF-1 α untuk pembuatan kurva standar HIF-1 α ³⁹



Gambar 3.2. Seri dilusi larutan standar Mb untuk pembuatan kurva standar Mb⁴⁰

3.8.6.4. Prosedur Pengukuran Kadar HIF-1 α dan Mb dengan ELISA

Semua reagen dan sampel diletakkan pada suhu ruang sebelum digunakan. Sampel disentrifugasi kembali sebelum digunakan. Pengukuran dilakukan dalam duplo untuk semua sampel.

100 μ L larutan standar, blanko dan sampel dimasukkan ke setiap sumur pada *microplate* yang telah dilapisi antibodi spesifik HIF-1 α dan Mb. *Microplate* ditutup menggunakan sealer yang tersedia. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.

Cairan di setiap sumur dibuang, tanpa dilakukan pencucian. Selanjutnya 100 μ L larutan antibodi berlabel biotin dimasukkan ke setiap sumur. *Microplate* ditutup menggunakan sealer yang tersedia. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Kemudian cairan di setiap sumur dibuang dan dilakukan pencucian hingga 3 kali dengan penambahan $\pm$ 350 μ L *dapat pencuci* pada setiap sumur.

100 μ L larutan konjugat HRP dimasukkan ke setiap sumur. *Microplate* ditutup menggunakan sealer yang tersedia. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian cairan di setiap sumur dibuang dan dilakukan pencucian hingga 5 kali dengan penambahan $\pm$ 350 μ L *dapat pencuci* pada setiap sumur.

90 μ L larutan substrat dimasukkan ke setiap sumur. *Microplate* ditutup menggunakan sealer yang baru dan terlindung dari cahaya. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 15-30 menit sampai terlihat gradien perubahan warna pada sumur standar. Kemudian 50 μ L larutan penyetop dimasukkan ke setiap sumur dan dilakukan pembaruan seragam pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate* ELISA reader.

3.9. Analisis Statistik

Uji statistik dalam penelitian ini menggunakan aplikasi *Graphpad Prism v.5.3*. *La Jolla*, CA, USA. Data yang didapat dari setiap parameter dinyatakan dalam nilai rerata $\pm$ SEM, yang kemudian ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik. Semua data dilakukan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk.

Jika sebaran data normal dan homogen, analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik. Untuk menguji kebermaknaan antar kelompok dengan jumlah kelompok

lebih dari 2 kelompok dilakukan dengan uji ANOVA. Untuk menguji perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji *post hoc test* dengan uji Tukey.

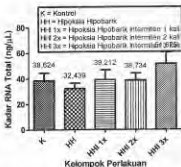
Namun, jika sebaran data tidak normal atau tidak homogen, analisis data dilanjutkan dengan uji non parametrik. Untuk menguji kebermaknaan antar kelompok dilakukan dengan uji Kruskal-Wallis. Untuk menguji perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan dengan uji Mann-Whitney.

Sedangkan untuk membandingkan dua variabel dilakukan dengan uji korelasi Pearson. Variabel yang dianalisis dianggap bermakna secara statistik apabila nilai $p < 0,05$.⁴¹

BAB IV HASIL PENELITIAN

4.1. Isolasi dan Kadar RNA Total

Hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa indeks kemurnian dan konsentrasi semua sampel RNA bervariasi. Dengan hasil tersebut RNA total yang diisolasi digunakan sebagai cetakan pada analisis RT-PCR. Pada waktu digunakan konsentrasi RNA semua sampel diseragamkan menjadi 100 ng/ μ L sesuai dengan rumus pengenceran. Hasil isolasi RNA total berupa pengamatan serapan, indeks kemurnian serta kadar RNA total disajikan pada Lampiran 2. Rerata kadar RNA total disajikan pada Gambar 4.1.

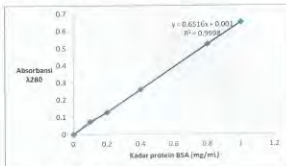


Gambar 4.1. Kadar RNA total rata-rata pada jantung tikus

4.2. Kadar Protein Total Jantung Tikus

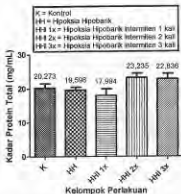
Pengukuran kadar protein total jantung tikus dilakukan dengan metoda Warburg-Christian menggunakan kurva standar protein *bovine serum albumin* (BSA). Kurva standar BSA diperoleh dari nilai serapan atau wali konsentrasi larutan BSA dengan nilai $R^2 = 0,9998$ disajikan pada Gambar 4.2.

Persamaan regresi ($y = 0,6516x + 0,001$) yang diperoleh dari kurva standar BSA digunakan untuk menghitung kadar protein total jantung tikus. Sumbu y adalah nilai serapan larutan protein pada panjang gelombang 280 nm dan sumbu x adalah kadar protein total yang diukur.



Gambar 4.2. Kurva Standar BSA

Hasil isolasi protein total berupa kadar protein total disajikan pada Lampiran 3. Rerata kadar protein total masing-masing kelompok disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Kadar protein total rata-rata pada jantung tikus

4.3. Desain Primer Mb, BNP-45 dan 18S rRNA

Desain dan analisis primer menggunakan *Primer-BLAST Tools* dari NCBI terdapat pada Lampiran 4. Desain primer yang diperoleh sesuai dengan rincian disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.1 Primer Mb, BNP-45¹⁸ dan 18S rRNA¹⁷

Gene	Posisi (pb)		Sekuensi	Produk PCR (pb)	Tm (°C)
Mb	201-222	F	5'-TTCAGAGGACCTGAAGAAGCAC-3'	150	59,96
NM_021586.2	353-330	R	5'-GAGATAAACTCCAGGTACTTGACC-3'		56,34
BNP-45	357-376	F	5'-TGGGCAGAGAATAGACCCGA-3'	62	60,03
NM_031545.1	418-399	R	5'-ACAACCTCAGCCCGTCACAG-3'		62,38
18S rRNA	881-906	F	5'-GGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'	219	57,02
NF_046237.1	1099-1090	R	5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'		58,06

4.4. Hasil Optimasi Suhu *Annealing* Primer

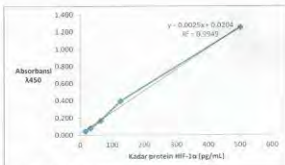
Optimasi suhu *annealing* primer bertujuan untuk mengetahui suhu optimum primer dapat menempel pada cetakan cDNA. Suhu *annealing* optimum dipilih berdasarkan puncak kurva lebur (*melting curve*) tertinggi dan nilai Ct terendah terdapat pada lampiran 5. Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing*, diperoleh suhu *annealing* optimum dari setiap gen yaitu 57,44°C untuk gen 18S rRNA, gen Mb, dan 60,78°C untuk gen BNP-45.

4.5. Pengaruh Hipoksia terhadap Stabilisasi Protein HIF-1 α

4.5.1. Analisis Kadar Protein HIF-1 α pada Jantung Tikus dengan Metode ELISA

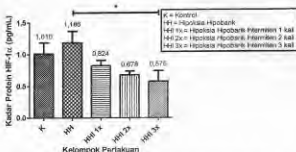
Pengukuran kadar protein HIF-1 α jantung tikus dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* menggambar kurva standar protein HIF-1 α . Kurva standar HIF-1 α diperoleh dari nilai serapan satu seri dilusi larutan standar HIF-1 α yang disediakan kit ELISA dengan nilai $R^2 = 0,9949$ disajikan pada Gambar 4.4.

Persamaan regresi ($y = 0,0025x + 0,0704$) yang diperoleh dari kurva standar HIF-1 α digunakan untuk menghitung kadar protein HIF-1 α jantung tikus. Sumbu y adalah nilai serapan larutan protein pada panjang gelombang 450 nm dan sumbu x adalah kadar protein HIF-1 α yang diukur.



Gambar 4.4. Kurva Standar HIF-1α

Data kadar protein HIF-1α jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol disajikan pada Lampiran 5. Rata-rata kadar protein HIF-1α masing-masing kelompok disajikan pada Gambar 4.5. Kadar protein HIF-1α mengalami peningkatan pada kelompok tikus hipoksia hipobarik dibandingkan dengan kelompok kontrol, kemudian terus menurun pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali. Analisis statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Berdasarkan uji ANOVA terdapat perbedaan bermakna antara kadar protein HIF-1α kelompok hipoksia dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$).

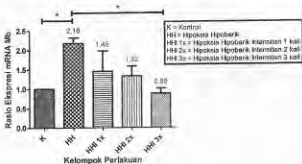


Gambar 4.5. Kadar protein HIF-1α per protein total rata-rata pada jantung tikus dengan metode ELISA. Hasil uji komparasi dengan uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok tikus hipoksia dan kontrol ($p=0.0437$). *berbeda bermakna antara hipoksia hipobarik dengan 4 kali.

Pengukuran ekspresi relatif mRNA Mb pada jantung tikus dilakukan dengan metode Real Time RT-PCR yang dilihat dari serapan fluoresensi SYBR Green selama amplikasi berlangsung. Nilai serapan diperoleh dari titik potong antara kurva amplikasi dengan garis ambang (*threshold*) yang disebut dengan nilai Ct (*Cycle threshold*). Nilai Ct gen referensi 18S rRNA lebih kecil dibandingkan dengan nilai Ct Mb, artinya gen referensi 18S rRNA lebih dahulu teramplifikasi dibandingkan dengan Mb. Analisis kurva lebur memperlihatkan titik lebur yang sama pada Mb dan 18S rRNA. Suhu titik lebur Mb dan 18S rRNA pada 57,44°C.

Analisis ekspresi relatif mRNA dilakukan dengan metode Livak. Data yang digunakan adalah nilai rata-rata Ct dari masing-masing sampel dari kedua gen Mb dan 18S rRNA. Data rasio ekspresi relatif mRNA Mb jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol disajikan pada Lampiran 6. Hasil analisis ekspresi mRNA Mb yang disajikan pada Gambar 4.6 memperlihatkan rasio ekspresi mRNA Mb pada kelompok hipoksia

hipobarik mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol, kemudian terus menurun pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali. Analisis statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Berdasarkan uji ANOVA terdapat perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$).

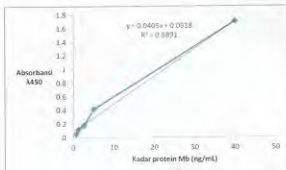


Gambar 4.6. Ekspresi relatif mRNA Mb pada jantung tikus (data dinormalisasi terhadap kontrol). Hasil uji kemaknaan dengan uji ANOVA menunjukan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok tikus Hipoksia dan kontrol ($p = 0,0283$). Terjadi perbedaan bermakna antara hipoksia hipobarik dengan kontrol dan hipoksia hipobarik intermiten 3 kali.

4.6.2. Analisis Kadar Protein Mb pada Jantung Tikus dengan Metode ELISA

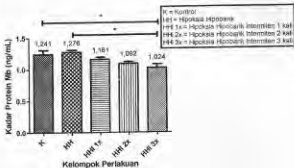
Pengukuran kadar protein Mb jantung tikus dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* menggunakan kurva standar protein Mb. Kurva standar Mb diperoleh dari nilai serapan satu seri dilusi larutan standar Mb yang disediakan kit ELISA dengan nilai $R^2 = 0,9922$ disajikan pada Gambar 4.7.

Persamaan regresi ($y = 0,0594x + 0,0471$) yang diperoleh dari kurva standar Mb digunakan untuk menghitung kadar protein Mb jantung tikus. Dimana y adalah nilai serapan larutan protein pada panjang gelombang 450 nm dan x adalah kadar protein Mb yang diukur.



Gambar 4.7. Kurva Standar Mb

Data kadar protein Mb jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol disajikan pada Lampiran 7. Rata-rata kadar protein Mb masing-masing kelompok disajikan pada Gambar 4.8. Kadar protein Mb mengalami peningkatan pada kelompok tikus hipoksia hipobarik dibandingkan dengan kelompok kontrol, kemudian terus menurun pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali. Analisis statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Berdasarkan uji ANOVA terdapat perbedaan bermakna antara kadar protein Mb kelompok hipoksia dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$).



Gambar 4.6. Kadar protein Mb per protein total rata-rata pada jantung tikus dengan metode ELISA. Hasil uji kemaknaan dengan uji ANOVA menunjukan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok tikus hipoksia dan kontrol ($p < 0.017$). *berbeda bermakna antara hipoksia hipobarik intermiten 3 kali dengan kontrol dan hipoksia hipobarik.

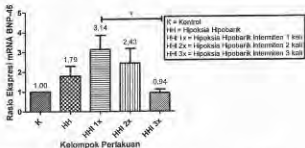
4.7. Regulasi Ekspresi BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia

4.7.1. Analisis Ekspresi Relatif mRNA BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia

Pengukuran ekspresi relatif mRNA BNP-45 pada jantung tikus dilakukan dengan metode *Real Time RT-PCR* yang dilihat dari serapan fluoresens *SYBR Green* selama amplifikasi berlangsung. Nilai serapan diperoleh dari titik potong antara kurva amplifikasi dengan garis ambang (*threshold*) yang disebut dengan nilai *Ct* (*Cycle threshold*). Nilai *Ct* gen referensi 18S rRNA lebih kecil dibandingkan dengan nilai *Ct* BNP-45, artinya gen referensi 18S rRNA lebih dahulu teramplifikasi dibandingkan dengan BNP-45. Analisis kurva lebur memperlihatkan titik lebur yang berbeda pada BNP-45 dan 18S rRNA. Suhu titik lebur BNP-45 pada 60,78°C dan 18S rRNA pada 57,44°C.

Analisis ekspresi relatif mRNA dilakukan dengan metode *Lyrik*. Data yang digunakan adalah nilai rata-rata *Ct* dari masing-masing sampel dari kedua gen, BNP-45 dan 18S rRNA. Data rasio ekspresi relatif mRNA BNP-45 jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol disajikan pada Lampiran 8. Hasil analisis ekspresi mRNA BNP-45

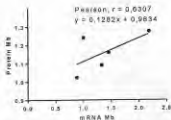
yang disajikan pada Gambar 4.9 memperlihatkan rasio ekspresi mRNA BNP-45 pada kelompok hipoksia hipobarik 1 hingga 3 kali mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol, kemudian terus menurun pada hipoksia hipobarik 3 hingga 4 kali. Analisis statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Berdasarkan uji ANOVA terdapat perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$).



Gambar 4.9. Ekspresi relatif mRNA BNP-45 pada jantung tikus (data dinormalisasi terhadap kontrol). Hasil uji korelasi dengan uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok stres hipoksia dan kontrol ($p < 0,0314$). *berbeda bermakna antara hipoksia hipobarik intermitten 1 kali dengan hipoksia hipobarik intermitten 3 kali

4.8. Hasil Uji Korelasi Ekspresi Relatif mRNA Mb dengan Kadar Protein Mb

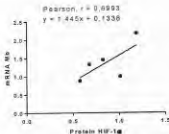
Hasil uji korelasi ekspresi relatif mRNA Mb dan kadar protein Mb menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan tidak bermakna dengan nilai $r = 0,6307$ dan $p > 0,05$, terlihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Perbandingan mRNA Mb dengan protein Mb. Korelasi Pearson, $r=0,6307$, $p=0,2539$.

4.9. Hasil Uji Korelasi Kadar Protein HIF-1 α dengan Ekspresi Relatif mRNA Mb

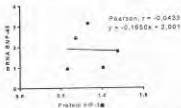
Hasil uji korelasi kadar protein HIF-1 α dan ekspresi relatif mRNA Mb menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan tidak bermakna dengan nilai $r=0,6993$ dan $p>0,05$, terlihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Perbandingan protein HIF-1 α dengan mRNA Mb. Korelasi Pearson, $r=0,6993$, $p=0,1887$.

4.10. Hasil Uji Korelasi Kadar Protein HIF-1 α dengan mRNA BNP-45

Hasil uji korelasi kadar protein HIF-1 α dan ekspresi relatif mRNA BNP-45 menunjukkan adanya hubungan yang sangat lemah dan tidak bermakna dengan nilai $r = -0,0433$ dan $p > 0,05$, terlihat pada Gambar 4.13.



Gambar 4.12. Perbandingan protein HIF-1 α dengan mRNA BNP-45, Korelasi Pearson, $r = -0,0433$, $p = 0,945$.

BAB V PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan menganalisis respon tubuh terhadap kondisi hipoksia, menggunakan tikus sebagai hewan coba. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan berdasarkan banyaknya induksi hipoksia. Induksi hipoksia dilakukan dengan menempatkan tikus dalam ruang hipoksia hipobarik (*hyvaux hypobaric chamber*). Ruang ini dibuat sedemikian rupa dengan pengutaran lekuan O_2 yang sesuai dengan ketinggian. Induksi hipoksia dilakukan secara bertahap. Organ jantung merupakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

Perlakuan induksi hipoksia pada penelitian ini diberikan dengan beberapa variasi waktu, yaitu hipoksia hipobarik (pada hari 1), hipoksia hipobarik intermitten 1 kali (pada hari 1 dan 8), hipoksia hipobarik intermitten 2 kali (pada hari 1, 8 dan 15), dan hipoksia hipobarik intermitten 3 kali (pada hari 1, 8, 5 dan 22). Hal ini berdasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Mulyawan³⁹, yang memberi fokus perlakuan hipoksia hipobarik intermitten. Hasil penelitian Mulyawan tentang ekspresi HIF-1 α pada jaringan otak tikus mengalami adaptasi terhadap induksi hipoksia hipobarik intermitten.

Saat tubuh mengalami kondisi hipoksia, secara adaptif tubuh akan memberikan respon secara sistemik maupun seluler untuk memenuhi kebutuhan oksigen. Semena⁴⁰ menyebutkan bahwa pada kondisi hipoksia sistemik terjadi peningkatan ekspresi eritropoietin (Epo) yang menyebabkan peningkatan jumlah sel darah merah sebagai molekul pembawa oksigen. Pada penelitian tersebut diketahui bahwa pada kondisi hipoksia, HIF-1 α merupakan faktor transkripsi yang meningkatkan ekspresi Epo.

Peredaran darah ke seluruh tubuh diatur melalui tekanan darah, yang bergantung pada pompa jantung dan aliran darah. Edokardi, dkk.⁴² menyebutkan bahwa pada tikus yang mengalami hipoksia terjadi peningkatan tekanan darah. Oleh karena itu, organ jantung dipilih sebagai sampel pada penelitian ini.

5.1. Ekspresi HIF-1 α pada Jantung Tikas Hipoksia Hipobarik Intermiten

Protein HIF-1 α selalu diekspresikan oleh sel baik dalam keadaan normoksia maupun hipoksia, namun protein HIF-1 α akan mengalami stabilisasi dalam keadaan hipoksia.⁴³ Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar protein HIF-1 α pada jantung tikas, hasilnya memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikas kontrol dan hipoksia (Gambar 4.5). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol kadar protein HIF-1 α mengalami peningkatan pada kelompok hipoksia hipobarik, kemudian mengalami penurunan pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali, dan kadar tertinggi terlihat pada hipoksia hipobarik. Artinya ada peningkatan kadar protein HIF-1 α dalam kondisi hipoksia sistemik dan terjadi adaptasi secara bertahap yang terus membaik di tingkat seluler pada kondisi hipoksia intermiten.

Peningkatan ini diduga terjadi karena sel atau jaringan mulai beradaptasi terhadap kondisi hipoksia. Liu, dkk⁴⁴ menyebutkan bahwa secara signifikan terjadi peningkatan konsentrasi protein yang terlibat di dalam mekanisme adaptasi terhadap hipoksia, seperti peningkatan kadar protein HIF-1 α yang akan meregulasi gen-gen yang berhubungan dengan angiogenesis, eritropoiesis, proliferasi, diferensiasi serta apoptosis sel.

Kadar protein HIF-1 α diatur oleh sejumlah faktor. Selain pengaturan pada tingkat mRNA, jalur sinyal PTK melalui PI3K dan MAPK menjadi jalur utama persinyalan ditranslasinya mRNA HIF-1 α menjadi protein.⁴² Selain itu, modifikasi pasca translasi melalui pengikatan protein HIF-1 α dengan HSP90 juga ikut mengatur kadar protein HIF-1 α .⁴⁴

HIF-1 α merupakan protein yang sangat bergantung dengan kadar oksigen. Ada tidaknya oksigen ikut mengatur kadar protein ini. Dalam kondisi normoksia, ketika jumlah oksigen cukup, HIF-1 α akan didegradasi oleh kompleks proteasom. Sedangkan dalam kondisi hipoksia HIF-1 α mengalami stabilisasi dengan cara membentuk heterodimer dengan HIF-1 β . Kemudian bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan HRE pada promotor gen target.⁴⁵

Pada penelitian ini pengukuran kadar protein HIF-1 α dilakukan pada jaringan jantung secara keseluruhan, tanpa memisahkan bagian-bagiannya. Kehutuhan sel-sel jantung akan oksigen untuk menjalankan aktivitasnya bergantung pada suplai oksigen dari sel darah merah yang dibawa oleh pembuluh darah. Secara keseluruhan hasil penelitian ini menunjukan bahwa respon mekanisme genetik sel-sel jantung terhadap kondisi kurangnya O₂ tetap berjalan. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya kadar protein HIF-1 α pada kondisi hipoksia sistemik dan terjadi mekanisme adaptasi secara bertahap yang terus membaik pada kondisi hipoksia intermiten. Ini berarti protein HIF-1 α hanya disintesis seperlunya, sesuai dengan kebutuhan jaringan jantung.

5.2. Ekspresi Mioglobin pada Jantung Tikus Hipoksia Hipobarik Intermiten

Mioglobin adalah hemoprotein yang terdapat di sitoplasma. Mioglobin memiliki fungsi sebagai protein pengikat dan penyimpan oksigen intraseluler dan memfasilitasi distribusi oksigen ke mitokondria pada proses transduksi energi.⁴² Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi relatif Mb pada jantung tikus pada tingkat mRNA dan protein.

Hasil pada tingkat mRNA memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikus kontrol dan hipoksia (Gambar 4.6). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ekspresi relatif mRNA Mb mengalami peningkatan pada kelompok hipoksia hipobarik, kemudian mengalami penurunan pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali, dan kadar tertinggi terlihat pada hipoksia hipobarik.

Hasil pada tingkat protein juga memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikus kontrol dan hipoksia (Gambar 4.8). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol kadar protein Mb mengalami peningkatan pada kelompok hipoksia hipobarik, kemudian mengalami penurunan pada hipoksia hipobarik intermiten 1 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali, dan kadar tertinggi terlihat pada hipoksia hipobarik. Artinya ada peningkatan ekspresi relatif mRNA dan protein Mb dalam

kondisi hipoksia sistemik dan terjadi adaptasi secara bertahap yang terus membaik di tingkat seluler pada kondisi intermiten.

Terjadinya peningkatan ekspresi Mb di jantung terkait erat dengan fungsi mioglobin dalam pengikutan O_2 darah selama hipoksia melalui potensinya sebagai enzim nitrat reduktase, ko-faktor nitrat oksida atau NO. Pada jantung, fungsinya sebagai nitrat reduktase diketahui dapat meningkatkan viabilitas sel jantung pada kondisi iskemia.⁴⁶

Hasil analisis statistik memperlihatkan korelasi positif yang sangat kuat antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mioglobin pada induksi hipoksia hipobarik intermiten menunjukkan bahwa peran HIF-1 α sebagai faktor transkripsi akan meningkatkan regulasi ekspresi berbagai gen. Gubay, dkk²⁰ menyebutkan bahwa HIF-1 α juga meningkatkan regulasi ekspresi gen pada metabolisme besi, yaitu pembentukan reseptor transferrin dan transferrin yang berperan penting dalam pembentukan protein mioglobin. Peningkatan protein mioglobin diperlukan karena mioglobin merupakan protein pengikat dan penyimpanan oksigen sehingga sel mempunyai cadangan oksigen yang cukup untuk melakukan metabolisme.

Hasil analisis statistik juga memperlihatkan korelasi yang lebih kuat antara kadar protein HIF-1 α dengan protein mioglobin dibandingkan dengan mRNA mioglobin. Hintze dan McCune⁴⁷ menyebutkan bahwa pada keadaan hipoksia, sel mengalami penurunan produksi energi akibat perubahan metabolisme energi dari metabolisme aerob menjadi metabolisme anaerob, namun absorpsi ion besi (Fe) mengalami peningkatan untuk menginisiasi proses eritropoiesis dan sintesis protein yang membutuhkan Fe seperti mioglobin.

5.3. Ekspresi BNP-45 pada Jantung Tikus Hipoksia Hipobarik Intermiten

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi relatif BNP-45 pada tingkat mRNA pada jantung tikus. Hasilnya memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok tikus kontrol dan hipoksia (Gambar 4.9). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ekspresi relatif mRNA Mb mengalami peningkatan pada kelompok hipoksia hipobarik hingga hipoksia hipobarik intermiten 1 kali, kemudian mengalami

paparan pada hipoksia hipobarik intermiten 2 kali hingga hipoksia hipobarik intermiten 3 kali, dan kadar tertinggi terlihat pada hipoksia hipobarik intermiten 3 kali. Artinya ada peningkatan ekspresi relung mRNA Mb dalam kondisi hipoksia sistemik dan terjadi adaptasi secara bertahap yang terus membaik di tingkat seluler pada kondisi intermiten.

Hasil analisis statistik memperlihatkan korelasi negatif antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA BNP-45 pada induksi hipoksia hipobarik intermiten, artinya semakin rendah kadar protein HIF-1 α semakin tinggi ekspresi mRNA BNP-45. Sebagai perbandingan, pada penelitiannya *Serdinal*¹⁶ memperlihatkan korelasi positif yang kuat antara kadar protein HIF-1 α dengan ekspresi mRNA BNP-45 pada induksi hipoksia sistemik kronik.

Hal ini diduga terjadi karena induksi hipoksia sistemik kronik menyebabkan jantung mengalami tekanan yang berlebih, dinding ventrikel jantung memegang dan struktur miokard jantung rusak, sehingga menimbulkan rangsangan terjadinya sekresi BNP. Pada penelitiannya *Soo*, dik memberikan tekanan yang berlebih pada jantung tikus menggunakan infus Angiotensin II, menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi mRNA BNP sebesar 5,2 kali dibanding kontrol.

Pada kondisi hipoksia hipobarik intermiten, ekspresi HIF-1 α akan terekspresi dan terdegradasi. Hal ini akan mempengaruhi ekspresi BNP-45. Pada penelitian ini ekspresi BNP-45 di dalam sel otot jantung menurun sejalan dengan jumlah paparan hipoksia. Hal ini diduga terjadi karena peran HIF-1 α sebagai master switch gene menyebabkan terjadinya proses adaptasi berupa hypoxia preconditioning dan memberi efek protektif pada jantung.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Pada tikus yang mengalami hipoksia hipobarik intermiten terjadi penyesuaian pada berbagai jaringan termasuk jantung. Pada organ ini terjadi peningkatan kadar protein HIF-1 α , peningkatan ekspresi relatif mRNA dan kadar protein Mb yang sejalan satu dengan yang lainnya serta peningkatan ekspresi relatif mRNA BNP-45.

Hubungan antara ekspresi relatif mRNA Mb dengan protein Mb kuat. Hubungan antara protein HIF-1 α dengan ekspresi relatif mRNA Mb kuat. Hal ini dapat dipahami karena otot jantung membutuhkan mioglobin untuk mengikat dan menyimpan oksigen secara terus menerus untuk melakukan metabolisme energi.

Hubungan antara protein HIF-1 α dengan ekspresi relatif mRNA BNP-45 memperlihatkan korelasi negatif, artinya semakin rendah kadar protein HIF-1 α semakin tinggi ekspresi mRNA BNP-45. Hal ini diduga terjadi karena induksi hipoksia hipobarik intermiten menyebabkan jantung mengalami iskemia yang berlebih sehingga menyebabkan sekresi BNP. Beberapa kemungkinan lainnya antara lain pada tingkat seluler jantung sangat responsif terhadap kekurangan oksigen atau karena pada jantung BNP disintesis dalam bentuk inaktif.

6.2. Saran

Untuk itu disarankan melakukan pengukuran kadar protein Mb dan BNP-45 dengan metode ELISA pada darah tikus yang mengalami kondisi hipoksia hipobarik intermiten untuk memperlihatkan bahwa Mb dan BNP-45 dapat dijadikan sebagai penanda terjadinya peningkatan beban jantung. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian dengan cara pengambilan sampel langsung dari otot jantung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol*. 2004; 96(3): 1173-7
2. Loianone LA, Shapiro DS. Detection of hypoxia at the cellular level. *Crit Care Clin*. 2010 (26): 409-21.
3. Priyanti, Ani Retno. Peran hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) dalam pengaturan ekspresi gen. Disertasi. Jakarta: FKUI, Program Doktor Ilmu Biomedik; 2010.
4. Syam AF. Patofisiologi molekuler perkembangan lesi mukosa gaster ulkus pada hipoksia sistemik kronik. Tinjauan ekspresi hypoxia inducible factor-1 α , heat shock factor-1, heat shock protein 70. Disertasi. Jakarta: FKUI, Program Doktor Ilmu Biomedik; 2011.
5. Shao G, et al. Hypoxia preconditioning improves spatial cognitive ability in mice. *Neurosignals*. 2006 (7): 314-21.
6. Joseph Loscalzo. The cellular response to hypoxia: tuning the system with mRNAs. *J Clin Invest*. 2010 (120): 3815-17.
7. Ratcliffe, Peter J. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*. 2007 (117): 862-5.
8. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: The known and unknown of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*. 2004; 51(3): 563-78.
9. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function and disease. *Genes and development*. 2004 (18): 2183-94.
10. Reinert R. Basic flight physiology. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill; 1996.
11. Muray CE, Jamming RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 (74): 1124-36
12. Shao G, et al. Hypoxia preconditioning improves spatial cognitive ability in mice. *Neurosignals*. 2006 (7): 314-21.
13. Jents NM, Lee EM, Brown TG, Jarrot B, Heist PM. Hypoxia preconditioning produces differential expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its regulatory enzyme HIF prolyl hydroxylase 2 in neonatal rat brain. *Neuroscience letters*. 2006 (404): 72-7.
14. Hidayat A, Wundisastu K, Hermawan B, Achmad TA. Paparan hipoksia hipotank intermiten menurunkan stres oksidatif dan apoptosis sel jantung pada tikus jantan Sprague dawley. *J Ind Med Assoc*. 2011 (51)

15. Puspitaningrum, R. Ekspresi dan karakterisasi molekul miooglobin tikus *chelonys mydas* sebagai model protein pengikat dan penyimpan oksigen hewan toteman hipoksia. Jakarta: FKUI. Disertasi. 2010.
16. Ferdinal, F. Mekanisme molekul gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran hypoxia inducible factor-1 α dalam regulasi ekspresi gen b-type natriuretic peptide-45. Jakarta: FKUI. Disertasi. 2009.
17. Hilkoj RJ, Frampton CM, Yandle TG, Troughton RW, Lainchbury JG, et al. B-type natriuretic peptide infusions in acute myocardial infarction. *Heart*. 2008 (94): 617-22.
18. Riddle C. Oxygen: the two-faced elixir of life. *AANA Journal*. 2008; 76(1): 61-8. Available from: https://www.aana.com/newsandjournal/documents/course0208_p61-68.pdf.
19. Mulyawan, W. Analisa respon adaptasi jaringan otak pusa induksi hipoksia hipobarik intermiten pada tikus: kajian khusus terhadap ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* . Jakarta: FKUI. Disertasi. 2012.
20. Gilany K, Yafiknah M. Hypnosis: a review. *Journal of Paramedical Sciences*. 2010; 1(2): 43-60.
21. Wang GL, Jiang BH, Roe EA, Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O $_2$ tension. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 (92): 5510-14.
22. Pandey J, Gori TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Res*. 2006 (71): 642-51.
23. Kimbro KS, Simoes JW. Hypoxia inducible factor 1 in human breast and prostate cancer. *Endocr-relate cancer*. 2006 (13): 739-49.
24. Gradwell, DP. Hypoxia in training's aviation medicine. 4th ed. Hodder Arnold. 2006: 41.
25. Hidayat, A. Pengaruh perbedaan jumlah paparan hipoksia hipobarik intermiten terhadap daya tahan jantung melalui ekspresi protein Bcl-2, MnSOD, LDH, Caspase-3 dan kadar asam laktat pada tikus jantan spengue dawley. Bandung: FK Universitas Padjadjaran. Disertasi. 2011.
26. Lehmgut, AL. Principles of biochemistry. New York: WH Freeman and Company. 2008.
27. Cota URM, Fogel U, Kelm M, Rassaf T. Unraveling the janes of myoglobin in health and disease. *The Journal of Experimental Biology*. 2010 (213): 2734-40.
28. Stranberg B, Dickerson RE, Rossmann MG. Fifty years of protein structure analysis. *J. Mol. Biol*. 2009; 32(2): 2-31.

29. Robach P, et al. Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. *Blood Journal*. 2007; 1-37.
30. Ordway GA, Garry DJ. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *The Journal of experimental Biology*. 2004 (207): 3441-6.
31. Flogel U, Fago A, Rassaf T. Keeping the heart in balance: the functional interactions of myoglobin with nitrogen oxides. *The Journal of Experimental Biology*. 2010 (213): 2726-33.
32. Krupicka J, Janota T, Kasalova Z, Hradek J. Natriuretic peptides-physiology, pathophysiology and clinical use in heart failure. *Physiol Res*. 2009 (58): 175-7.
33. Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clinical Sciences*. 2016 (130): 57-77.
34. Lisy O, et al. Renal actions of synthetic decapeptide natriuretic peptide. *Kidney International*. 1999 (56): 502-8.
35. Hirsch JR, Meyer M, Friesmann WG. ANP and urodilatin: who is who in the kidney. *Eur J Med Res*. 2006 (11): 447-54.
36. Gupta A, Gupta N, Gupta DK. Molecular investigation in wistar rats by RAPD typing. *Science and Culture*. 2010; 76(7-8): 261-6.
37. Farma, SA. Respons HIF-1 α , anhidrase karbonat dan enzim konversi angiotensin pada paru tikus yang mengalami hipoksia sistemik kronis. Jakarta: FKUI. Tesis. 2014.
38. Ke Q, Costa M. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70(5): 1469-80.
39. Elabscience. Rat hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) ELISA Kit. Manual Instruction. Elabscience; 2015).
40. Elabscience. Rat myoglobin (MYO) ELISA Kit. Manual Instruction. Elabscience; 2015).
41. Dahlan MS. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Salemba Medika. 2012.
42. Edelkard BW, Weidemann A, Wamcke C, Rosenberger C, Wiesener MS. Role of hypoxia in pathogenesis of renal disease. *Kidney Int*. 2005 (68): 46-51.
43. Prabhu NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia inducible factors 1 and 2. *Physiol Res*. 2012; 92(3): 967-1003.

44. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Maasharumani M, Cole RN, et al. Calcineurin promotes hypoxia inducible factor 1 alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem.* 2007; 282(51): 37064-73.
45. Amelia R. Deteksi protein mioglobin dengan teknik imunoblot pada jaringan jantung, hati dan otak *rattus norvegicus* pada kondisi normal, Jakarta: THIPA UNI Skripsi. 2011.
46. Levent DZ, Fernandes BO, Riley HL, Martin DS, Mitchell K, Leckstrom CA, et al. The role of nitrogen oxides in human adaptation to hypoxia. *Scientific Report* 2014; 1(108): 1-8.

LAMPIRAN

Lampiran 1: Keterangan Lohos Kaji Etik



Komite Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo

Health Research Ethics Committee
Faculty of Medicine Universitas Indonesia
Cipto Mangunkusumo Hospital



Jalan Sekeloa Utara No. 2, Jakarta Pusat 10130, Telp. 021-21522000, Email: etk@rscm.com

Referensi: *SpIF* 0101/ETIK/2014

KETERANGAN LOHOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak, insaf dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran, telah rangkai dengan bentuk prosedur berikut:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regard to the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Neuroplastisitas Sebagai Respons Adaptasi Jaringan Otak pada Tikus Sprague Dawley Pasca Insulasi Hipofisis Hipofektik Intermiten".

Peneliti Utama

: dr. Fanny Septiani Farhan, M.Biomed

Principal Investigator

Nama Institusi

: Program Studi Biomedik FKUI

Name of the Institution

dan telah menyetujui prosedur tersebut di atas.
And approved the above-mentioned protocol.



Prof. Dr. Rianto Setiabudi, SpFK

**Ethical approval for this research has been given by permission*

for the following:

1. Mengetahui dan memahami secara menyeluruh penelitian
2. Mengetahui dan memahami secara menyeluruh penelitian
 - a. Untuk subjek penelitian kedokteran yang bersifat penelitian kedokteran, sebagai berikut:
 - i. Penelitian dasar dan terapan kedokteran
 - ii. Penelitian klinis kedokteran
 - iii. Penelitian farmakologi kedokteran
 - iv. Penelitian patologi kedokteran
 - v. Penelitian fisiologi kedokteran
 - vi. Penelitian gizi kedokteran
 - vii. Penelitian kesehatan masyarakat
 - viii. Penelitian kesehatan lingkungan
 - ix. Penelitian kesehatan masyarakat
 - x. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xi. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xii. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xiii. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xiv. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xv. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xvi. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xvii. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xviii. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xix. Penelitian kesehatan masyarakat
 - xx. Penelitian kesehatan masyarakat

Lampiran 2: Data kadar RNA total jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol

Sampel	Fotometrik (A 260/280)	Konsentrasi	Kadar RNA (ng/ μ L)	Rerata	SE
1K	0,083	1,988	30,470	38,624	5,938
2K	0,201	2,025	37,300		
3K	0,153	2,039	33,215		
4K	0,216	2,046	30,305		
5K	0,122	1,826	61,830		
1-1x	0,137	2,087	26,795	32,439	4,224
2-1x	0,171	2,094	47,505		
3-1x	0,136	2,060	34,955		
4-1x	0,081	2,004	29,660		
5-1x	0,161	1,963	23,280		
1-2x	0,147	2,049	49,825	39,212	7,712
2-2x	0,152	1,996	44,115		
3-2x	0,069	2,054	20,485		
4-2x	0,116	2,097	59,485		
5-2x	0,143	1,822	22,150		
1-3x	0,115	1,935	56,245	38,734	5,512
2-3x	0,137	1,849	31,105		
3-3x	0,128	2,048	27,310		
4-3x	0,158	1,668	32,050		
5-3x	0,103	1,649	46,960		
1-4x	0,173	2,063	42,015	51,675	8,921
2-4x	0,080	2,066	28,985		
3-4x	0,202	2,072	81,980		
4-4x	0,166	2,006	58,320		
5-4x	0,103	2,044	47,075		

Lampiran 3: Data kadar protein total jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol

Sampel	A1	A2	Ar	Kadar Protein (mg/mL)	x50 (mg/mL)	Rerata Kadar Protein Total (mg/mL)	SE
1K	0,210	0,221	0,216	0,329	16,459	20,273	1,246
2K	0,233	0,261	0,247	0,376	18,877		
3K	0,279	0,292	0,286	0,437	21,831		
4K	0,261	0,274	0,268	0,409	20,450		
5K	0,303	0,318	0,311	0,475	23,749		
1-1x	0,274	0,286	0,280	0,428	21,409	19,598	0,865
2-1x	0,273	0,264	0,269	0,411	20,526		
3-1x	0,216	0,220	0,218	0,333	16,651		
4-1x	0,237	0,251	0,244	0,373	18,646		
5-1x	0,266	0,277	0,272	0,415	20,757		
1-2x	0,172	0,181	0,177	0,269	13,467	17,994	1,251
2-2x	0,219	0,231	0,225	0,344	17,188		
3-2x	0,207	0,215	0,211	0,322	16,114		
4-2x	0,318	0,340	0,329	0,503	25,169		
5-2x	0,229	0,243	0,236	0,361	18,033		
1-3x	0,258	0,276	0,267	0,408	20,411	23,235	1,250
2-3x	0,279	0,303	0,291	0,445	22,253		
3-3x	0,275	0,291	0,283	0,433	21,639		
4-3x	0,347	0,373	0,360	0,551	27,548		
5-3x	0,311	0,325	0,318	0,486	24,325		
1-4x	0,260	0,281	0,271	0,414	20,680	22,836	1,567
2-4x	0,290	0,317	0,304	0,464	23,212		
3-4x	0,235	0,243	0,239	0,365	18,263		
4-4x	0,346	0,367	0,357	0,546	27,279		
5-4x	0,320	0,327	0,324	0,495	24,747		

Lampiran 4: Desain Primer

1. Primer Mb



Primer 1

Sequence (5'-3')	Template strand	Length	Start	Stop	GC%	Self-complementarity
Primer 1	TTGAGGAGGCTGAGGAGGAGG	16	101	116	50.00	0.00
Reverse primer	GAGGAGGAGGAGGAGGAGG	16	101	116	50.00	0.00
Product	16					
Primer 2	GAGGAGGAGGAGGAGGAGG	16	101	116	50.00	0.00
Reverse primer	TTGAGGAGGCTGAGGAGGAGG	16	101	116	50.00	0.00
Product	16					

Primer 2

Lampiran 5: Data kadar protein HIF-1 α jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol

Sampel	A1	A2	A ₃	Ur-B*	Kadar HIF- 1 α	Kadar HIF- 1 α x FP**	Kadar Protein (mg/mL)	Kadar HIF-1 α (pg/mg protein)	SE
1K	0,223	0,271	0,246	0,156	54,240	27,120	16,459	1,648	0,175
2K	0,196	0,195	0,196	0,100	54,040	17,020	18,877	0,902	
3K	0,179	0,187	0,183	0,093	59,040	14,520	21,831	0,665	
4K	0,227	0,216	0,222	0,132	44,440	22,220	20,450	1,087	
5K	0,195	0,204	0,200	0,110	35,640	17,820	23,749	0,750	
R								1,010	0,181
1-1x	0,284	0,213	0,249	0,159	55,240	27,620	21,409	1,290	
2-1x	0,200	0,141	0,171	0,081	34,040	12,020	20,326	0,586	
3-1x	0,249	0,242	0,246	0,126	54,040	27,020	16,651	1,623	
4-1x	0,217	0,271	0,244	0,154	53,440	26,720	18,646	1,433	
5-1x	0,202	0,226	0,214	0,124	41,440	20,720	20,757	0,998	0,083
R								1,186	
1-2x	0,154	0,177	0,166	0,076	22,040	11,020	13,467	0,818	
2-2x	0,135	0,212	0,174	0,084	25,240	12,620	17,188	0,734	
3-2x	0,149	0,181	0,165	0,075	21,840	10,920	16,114	0,678	
4-2x	0,204	0,205	0,205	0,115	37,640	18,820	25,169	0,748	0,062
5-2x	0,225	0,203	0,214	0,124	41,240	20,620	18,033	1,143	
R								0,824	
1-3x	0,203	0,196	0,200	0,110	35,640	17,820	20,411	0,873	
2-3x	0,159	0,206	0,183	0,093	28,840	14,420	22,253	0,648	
3-3x	0,172	0,156	0,164	0,074	21,440	10,720	21,639	0,495	0,167
4-3x	0,198	0,225	0,212	0,122	40,440	20,220	27,548	0,734	
5-3x	0,194	0,182	0,188	0,098	31,040	15,520	24,325	0,638	
R								0,678	
1-4x	0,207	0,255	0,231	0,141	48,240	24,120	20,680	0,166	
2-4x	0,210	0,179	0,195	0,105	33,640	16,820	23,212	0,725	0,167
3-4x	0,134	0,158	0,146	0,056	14,240	7,120	18,263	0,390	
4-4x	0,168	0,137	0,153	0,063	16,840	8,420	27,279	0,309	
5-4x	0,150	0,142	0,146	0,056	14,240	7,120	24,747	0,288	
R								0,575	

* Blanko = 0,09

** Faktor pengenceran = 500 kali

Lampiran 6: Data rasio ekspresi relatif mRNA Mb jantung tikus kelompok hipokala dan kontrol

SAMPEL	Rataan Ct 18S	Rataan Ct Mb	ΔCt (B-A)	ΔΔCt	Rasio Ekspresi (2 ^{-ΔΔCt})	Rataan Rasio Ekspresi	SE
K1	4.97	18.78	13.81	0.00	1.00	1.00	0
K2	4.35	20.85	16.51	0.00	1.00		
K3	4.27	22.03	17.77	0.00	1.00		
K4	4.33	18.73	14.40	0.00	1.00		
K5	4.83	18.24	13.41	0.00	1.00		
1-1x	4.80	18.69	13.89	-1.30	2.45	2.18	0.14
2-1x	5.87	19.90	14.03	-1.16	2.23		
3-1x	4.31	18.22	13.91	-1.27	2.41		
4-1x	4.71	18.77	14.06	-1.12	2.17		
5-1x	4.84	19.31	14.47	-0.71	1.64		
1-2x	4.94	18.31	13.38	-1.81	3.49	1.45	0.53
2-2x	4.66	20.47	15.79	0.60	0.66		
3-2x	4.30	19.88	15.58	0.40	0.76		
4-2x	4.70	19.34	14.64	-0.54	1.45		
5-2x	4.96	20.27	15.32	0.14	0.91		
1-3x	4.91	20.35	15.44	0.26	0.84	1.32	0.26
2-3x	5.50	20.21	14.71	-0.47	1.39		
3-3x	5.05	19.44	14.39	-0.79	1.73		
4-3x	5.56	19.72	14.16	-1.02	2.03		
5-3x	5.64	21.45	15.81	0.63	0.65		
1-4x	5.34	20.31	14.97	-0.22	1.16	0.88	0.13
2-4x	5.15	20.47	15.32	0.14	0.91		
3-4x	3.97	20.19	16.22	1.04	0.49		
4-4x	5.22	21.04	14.97	-0.21	1.16		
5-4x	5.28	21.31	15.96	0.58	0.67		

Lampiran 7: Data kadar protein Mb jantung tikus kelompok hipoksia dan kontrol

Sampel	A1	A2	Ar	Ur-B*	Kadar Mb	Kadar Mb s FP**	Kadar Protein (mg/mL)	Kadar Mb (ng/mg protein)	SE
K1	0.163	0.166	0.165	0.089	4.452	22.259	16.459	1.352	0.066
K2	0.181	0.169	0.175	0.099	4.711	23.556	18.877	1.248	
K3	0.177	0.189	0.183	0.107	4.909	24.543	21.831	1.124	
R								1.241	
1-1x	0.201	0.188	0.195	0.119	5.193	25.963	21.409	1.213	
2-1x	0.259	0.148	0.204	0.128	5.415	27.074	20.526	1.319	0.032
3-1x	0.167	0.151	0.159	0.083	4.316	21.580	16.651	1.296	
R								1.276	
1-2x	0.119	0.116	0.118	0.042	3.291	16.457	13.467	1.222	
2-2x	0.137	0.14	0.139	0.063	3.810	19.049	17.188	1.108	
3-2x	0.137	0.132	0.135	0.059	3.711	18.556	16.114	1.152	0.033
R								1.161	
1-3x	0.18	0.158	0.169	0.093	4.563	22.815	20.411	1.118	
2-3x	0.165	0.176	0.171	0.095	4.600	23.000	22.253	1.034	
3-3x	0.186	0.177	0.182	0.106	4.872	24.358	21.639	1.126	
R								1.092	0.029
1-4x	0.16	0.166	0.163	0.087	4.415	22.074	20.680	1.067	
2-4x	0.145	0.166	0.156	0.080	4.230	21.148	23.212	0.911	
3-4x	0.15	0.142	0.146	0.070	3.995	19.975	18.263	1.094	
R								1.024	

* Blanko = 0.076

** Faktor Pengenceran = 5 kali

Lampiran K: Data rasio ekspresi relatif mRNA BNP-45 jantung tikus kelompok hipokala dan kontrol

SAMPEL	Rataan Ct 18S	Rataan Ct BNP-45	ΔCt (B-A)	ΔΔCt	Rasio Ekspresi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Rataan Rasio Ekspresi	SE
K1	4.97	20.16	15.19	0	1.00	1.00	0
K2	4.35	21.09	16.75	0	1.00		
K3	4.27	22.09	17.83	0	1.00		
K4	4.33	19.56	15.24	0	1.00		
K5	4.83	18.68	13.85	0	1.00		
1-1x	4.80	20.00	15.20	-0.57	1.48	1.79	0.50
2-1x	5.87	21.42	15.55	-0.23	1.17		
3-1x	4.31	20.99	16.68	0.90	0.53		
4-1x	4.71	19.26	14.55	-1.53	2.34		
5-1x	4.84	18.83	13.99	-1.78	3.43		
1-2x	4.94	18.32	13.39	-2.39	5.22	3.14	0.71
2-2x	4.69	18.36	13.68	-2.10	4.27		
3-2x	4.30	19.51	15.22	-0.53	1.47		
4-2x	4.70	18.92	14.22	-1.55	2.93		
5-2x	4.96	19.87	14.92	-0.85	1.81		
1-3x	4.91	19.40	14.49	-1.28	2.43	2.43	0.74
2-3x	5.50	21.04	15.54	-0.23	1.17		
3-3x	5.05	18.43	13.38	-2.40	5.26		
4-3x	5.56	20.96	15.40	-0.37	1.29		
5-3x	5.64	20.40	14.76	-1.01	2.01		
1-4x	5.34	20.91	15.57	-0.20	1.15	0.94	0.18
2-4x	5.15	20.36	15.21	-0.56	1.47		
3-4x	3.97	20.80	16.84	1.07	0.48		
4-4x	5.22	21.64	16.43	0.66	0.64		
5-4x	5.28	21.11	15.83	0.05	0.96		

Lampiran 9: Draft artikel

Expression of hypoxia inducible factor-1 α , myoglobin, b-type natriuretic peptide-45 in heart rat tissue as adaptive response to intermittent hypobaric hypoxia exposure

Margretha Herawati¹, Mohamad Sadikin², Frans Ferdinal³

¹Master Programme in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine Tarumanagara University, Jakarta

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate whether preconditioning by intermittent hypoxia in a hypobaric chamber influences the adaptation of expression hypoxia inducible factor-1 α , myoglobin dan b-type natriuretic peptide-45 in heart rat tissue.

Methods: Twenty five male Sprague-Dawley rats were exposed to intermittent hypobaric hypoxia in a hypobaric chamber in Indonesian Air Force Institute of Aviation Medicine, for 49.5 minutes at various altitudes, 1 week interval for 4 times (day 1, 8, 15 and 22). HIF-1 α and Mb protein were measured with ELISA. mRNA expression of Mb and BNP-45 were measured with one step real time RT-PCR.

Results: HIF-1 α protein levels increased after induction of hypobaric hypoxia and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0437$). mRNA expression and protein of Mb increased after induction of hypobaric hypoxia and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0283$; 0.0170), and both are strongly correlated (Pearson, $r=0.6307$). mRNA expression of BNP-45 increased after induction of intermittent hypobaric hypoxia 1 time and continues to decrease after induction of intermittent hypobaric hypoxia 3 times (ANOVA, $p=0.0314$).

Conclusions: Adaptive response of HIF-1 α , Mb and BNP-45 occurs after induction of intermittent hypobaric hypoxia in rat heart. HIF-1 protein regulated the expression of Mb and BNP-45.

Keywords: intermittent hypobaric hypoxia, HIF-1 α , Mb, BNP-45

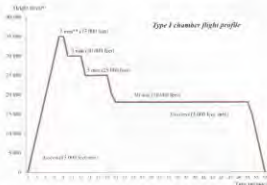
INTRODUCTION

Hypobaric hypoxia is hypoxia condition due to exposure on high altitude, for example in people who live in mountain areas, in unpresurized cabin flights of military and commercial airplanes.¹ The Indonesian Air Force Institute of Aviation Medicine (Lakespra Saryanto) provides hypobaric chamber training in order to expose pilots to hypobaric hypoxia. The training procedure is a simulation of hypobaric flights from zero ASL to 35,000 feet.² The purpose of this study is to investigate HIF-1 α , Mb and BNP-45 expression in heart rat under exposure in hypobaric hypoxia in acute and intermittent procedure.

MATERIAL AND METHODS

Animal Model and Sample Preparation

This experimental animal study was conducted in the Indonesian Air Force Institute of Aviation Medicine (Lakespra Saryanto) and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine University of Indonesia from 2015 to 2016. Twenty five male Sprague-Dawley rats (200-250g) were separated into five groups: control group without exposure to hypobaric hypoxia (Control), hypoxia group exposed to hypobaric hypoxia for one time (IHH), hypoxia preconditioning groups exposed to hypobaric hypoxia for two times (IHH 1x), for three times (IHH 2x), for four times (IHH 3x). The rats were exposed to type 1 hypobaric chamber training. The whole procedure took 49.5 minutes. The rats were anaesthetized using diethylether and decapitated. After decapitation, heart tissues of all samples were examined for HIF-1 α and Mb protein levels by ELISA, and for relative ratio gene expression of Mb and BNP-45 mRNA by real time RT-PCR. The procedure is shown in Figure 1



^{**}Deceleration level

^{***}Duration of induction for each stepwise according to the step of partial pressure (PO₂) reduction

Figure 1. The simulation of flight plan of intermittent hypobaric hypoxia exposure. Each procedure consist of 49.5 minutes of hypobaric hypoxia exposure.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

For quantification of HIF-1 α and Mb protein, ELISA was used. One hundred milligram of rat heart were homogenized in 1 mL PBS and centrifugated for five minutes at 5000g. Samples were prepared for ELISA by sandwich technique using Rat HIF-1 α ELISA kit (Elabscience) for HIF-1 α protein and Rat MYO ELISA kit (Elabscience) for Mb protein. An ELISA reader was used to measure optical density (OD) at 450 nm in standards, blanks and samples. The standard curve was created using Microsoft Excel and the regression equation $y = ax + b$ was applied to determine concentration of HIF-1 α and Mb protein.

RNA isolation and quantitative real time RT-PCR analysis

Total RNA was prepared from rat heart using Total RNA Mini Kit (tissue) (Genesid). The purity of the preparation was measured by the ratio between the absorbance at 260 nm and at 280 nm using a spectrophotometer Variskan Flash (Thermo Scientific).

Primers for Mb, BNP-45 and 18S as a housekeeping gene, were designed using online software from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The primers of Mb, BNP-45 and 18S is shown in Tabel 1.

Tabel 1 Primer Mb, BNP-45 dan 18S rRNA²

Gene	Posisi (pb)		Sekuens	Produk PCR (pb)	Tm (°C)
Mb	201-222	F	5'-TTCAGAGGACCTGAAGAAGCAC-3'	153	59,95
NM_021586.2	353-330	R	5'-GAGATAAACTCCAGGTACTTGACC-3'		58,34
BNP-45	357-375	F	5'-TGGGCAGAAGATAGACCGGA-3'	62	60,03
NM_031645.1	418-399	R	5'-ACAACCTCAGCCCGTCACAG-3'		62,38
18S rRNA	881-900	F	5'-CGCGGTTCATTTTGTGTG-3'	219	57,02
NR_046237.1	1099-1080	R	5'-AGTCGGGCGTCGTTTATGGTC-3'		58,06

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA. All data are expressed as mean $\pm$ SE. ANOVA analysis for parametric test in normal and homogenous samples was used. If necessary, a non-parametric test was applied.

RESULT

Effects of intermittent hypobaric hypoxia on HIF-1 α protein levels

HIF-1 α protein was detected in the five groups by ELISA using anti rat HIF-1 α detection antibody (Elabscience), results are shown in Figure 2.

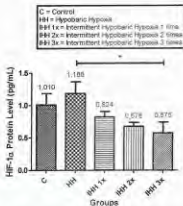


Figure 2. HIF-1 α protein concentration in heart rat tissue after intermittent hypobaric hypoxia exposure detected by ELISA using Rat HIF-1 α ELISA kit (Elastscience) *significantly different from the control group ($p=0.0437$, ANOVA test)

Effects of intermittent hypobaric hypoxia on Mb mRNA

The relative ratio of Mb mRNA in each group was calculated by the relative ratio of Mb to 18S, result are shown in Figure 3.

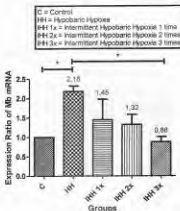


Figure 3. Relative expression ratio of Mb mRNA in heart rat tissue after intermittent hypobaric hypoxia exposure. *significantly different than the control group ($p < 0.0283$, ANOVA test)

Effects of intermittent hypobaric hypoxia on Mb protein levels

Mb protein was detected in the five groups by ELISA using anti rat Mb detection antibody (Elabscience), results are shown in Figure 4.

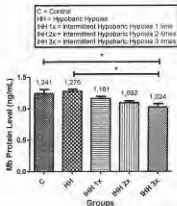


Figure 4. Mb protein concentration in heart rat tissue after intermittent hypobaric hypoxia exposure detected by ELISA using Rat MYO ELISA kit (Elabscience) significantly different than the control group ($p=0.0170$, ANOVA test)

Effects of intermittent hypobaric hypoxia on BNP-45 mRNA

The relative ratio of BNP-45 mRNA in each group was calculated by the relative ratio of BNP-45 to 18S, result are shown in Figure 5.

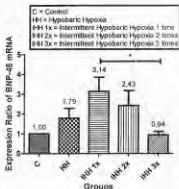


Figure 5. Relative expression ratio of BNP-45 mRNA in heart rat tissue after intermittent hypobaric hypoxia exposure *significantly different than the control group ($p=0.0314$, ANOVA test)

DISCUSSION

HIF-1 α protein level increases directly in hypobaric hypoxia and gradually decreases in intermittent hypobaric hypoxia for 3 times, but still higher than the control group (ANOVA, $p=0.0437$).

Expression ratio of Mb mRNA increases directly in hypobaric hypoxia and gradually decreases in intermittent hypobaric hypoxia for 3 times, but still higher than the control group (ANOVA, $p=0.0283$).

Mb protein level increases directly in hypobaric hypoxia and gradually decreases in intermittent hypobaric hypoxia for 3 times, but still higher than the control group (ANOVA, $p=0.0170$).

Expression ratio of BNP-45 mRNA increases directly in hypobaric hypoxia and intermittent hypobaric hypoxia for 1 time, and gradually decreases in intermittent hypobaric hypoxia for 3 times, but still higher than the control group (ANOVA, $p=0.0314$).

CONCLUSION

Response adaptation of HIF-1 α , Mb and BNP-45 occurs after induction of intermittent hypobaric hypoxia in rat heart. Proteins HIF-1 α regulate the expression of Mb and BNP-45.

REFERENCES

1. Gradwell, DP. Hypoxia in ernsting's aviation medicine. 4th ed. Hodder Arnold. 2006: 41.
2. Mulyawan, W. Analisis respons adaptasi jaringan otak pasca induksi hipoksia hipobarik intermiten pada tikus: kajian khusus terhadap ekspresi *hypoxia inducible factor-1 α* . Jakarta: FKUI. Disertasi. 2012.
3. Ferdinal, F. Mekanisme molekuler gagal jantung pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik: peran hypoxia inducible factor-1 α dalam regulasi ekspresi gen b-type natriuretic peptide-45. Jakarta: FKUI. Disertasi. 2009.
4. Farma, SA. Respons HIF-1 α , anhidrase karbonat dan enzim konversi angiotensin pada paru tikus yang mengalami hipoksia sistemik kronik. Jakarta: FKUI. Tesis. 2014.

Lampiran 10

DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITIAN

Nama : Margaretha Hernwati
 NPM : 1306362642
 Tempat / Tanggal Lahir : Jakarta / 12 Mei 1985
 Jenis Kelamin : Perempuan
 Agama : Katolik
 Alamat : Komplek Ujung Indah Blok B No 5,
 Pesanggrahan, Jakarta Selatan
 Email / HP : drg_margaretha@yahoo.com / 083112990760

Pendidikan:

2013-2016 : S2 Magister Ilmu Biomedik FKUI
 2003-2007 : S1 Kedokteran Gigi Univ. Prof. Dr. Moestopo (B)
 2000-2003 : SMU Tarakanita 1 Jakarta
 1997-2000 : SLTP Tarakanita 2 Jakarta
 1991-1997 : SD Tarakanita 3 Jakarta

Pekerjaan:

2011-sekarang : Staf pengajar FKG Univ. Prof. Dr. Moestopo (B)

Pengalaman Karya Tulis Ilmiah

Skripsi, 2007 dengan judul Perbandingan Penggunaan Mineral Trioxide Aggregate dan Kalsium Hidroksida pada Perawatan Apiksifikasi