

PENGARUH HIPOKSIA SISTEMIK KRONIK TERHADAP KADAR GLUTATION (GSH) PADA DARAH DAN GINJAL TIKUS SPRAGUE DAWLEY

oleh:

Hendra Aryudi Hamzah¹, Frans Ferdinal²

ABSTRACT

Chronic Systemic Effects of Hypoxia on the Concentration of Glutathione (GSH) in Blood and Kidney of *Sprague dawley*

The purpose of this study is to explore the effect of systemic hypoxia to amount of GSH in blood and kidney of *Sprague dawley* rats which is used to be an anti oxidant to decrease accumulation of ROS from hypoxia. The rats were divided into 7 groups (n = 4 per group) : Control normoxia group, hypoxia group were housed in hypoxic chambers (O₂ level 8%) for 1, 3, 6, 12, 24, 72 hours. The concentration of GSH was then detected by measuring absorbance of GSH in Rats' blood and kidney, and then the result would be used into standard formula of GSH. Compared to control group, GSH in blood and kidney of hypoxic group increased. There is significant correlation between concentration of GSH in blood and kidney.

Keywords : ROS, hypoxia, , GSH, blood, kidney, rats

ABSTRAK

Pengaruh Hipoksia Sistemik Kronik Terhadap Kadar Glutation (GSH) Pada Darah dan Ginjal Tikus *Sprague dawley*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hipoksia terhadap kadar GSH darah dan ginjal pada tikus *Sprague Dawley* yang berfungsi untuk menangkal akumulasi ROS sebagai hasil dari hipoksia. Hewan coba dibagi menjadi 7 kelompok (n = 4 per kelompok) : Kelompok kontrol (normoksia), kelompok yang mendapat perlakuan hipoksia di dalam sungkup hipoksia (kadar O₂ 8%) selama 1, 3, 6, 12, 24, dan 72 jam. Pemeriksaan kadar GSH dilakukan dengan mengukur

absorban GSH pada darah dan tikus, kemudian hasilnya akan dimasukkan kedalam rumus yang didapatkan dari kurva Standar. Dibanding dengan kelompok kontrol, GSH pada ginjal dan darah mengalami peningkatan. Terdapat korelasi yang bermakna antara kenaikan GSH pada darah dan ginjal..

Kata kunci : ROS, hipoksia, GSH, darah, ginjal, tikus

PENDAHULUAN

Oksigen merupakan molekul yang esensial bagi pertumbuhan dan perkembangan sel organisme aerob.^{1,2} Organisme aerob, dari prokariot sampai eukariot yang kompleks, memiliki kemampuan untuk mengindera dan memberikan respon terhadap perubahan kadar oksigen.

Mekanisme penginderaan oksigen (*oxygen sensing*) terjadi sebagai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia baik pada tingkat

sistemik maupun seluler.²

Dalam keadaan hipoksia terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species (ROS)*.^{3,4} Metabolit oksigen yang utama yang dihasilkan melalui reduksi satu-elektron oksigen adalah: superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil (OH^\cdot), dan bentuk oksigen yang tereduksi secara parsial, hidrogen peroksida (H_2O_2).⁵ Reduksi satu elektron pada H_2O_2 akan membentuk radikal yang sangat reaktif yaitu radikal hidroksil, melalui

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara

(Hendra Aryudi Hamzah)

²Staf Pengajar, Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara

(Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS)

reaksi Fenton atau Haber-Weiss.^{1,6} ROS dapat terbentuk pada semua jenis sel. ROS memiliki berbagai efek di dalam jaringan, yang dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan. Tergantung dari jenis dan jumlah ROS yang dihasilkan serta ketersediaan antioksidan jaringan. peningkatan jumlah ROS yang berlebihan dapat menimbulkan kerusakan protein dan membran sel, juga asam nukleat, bahkan sampai menyebabkan disfungsi dan kematian sel.⁶

Dalam kondisi istirahat, aliran darah ke ginjal mencapai 20% dari curah jantung sehingga terlihat ginjal tidak akan pernah kekurangan oksigen. Meskipun aliran darah ke ginjal tinggi, tapi tekanan oksigen di ginjal rendah, sehingga ginjal sangat rentan terhadap kekurangan oksigen.^{2,7,8} Keterbatasan suplai oksigen ke jaringan ginjal rentan terhadap hipoksia dan merupakan salah satu penyebab cedera akut pada ginjal.^{9,10,11}

Ginjal merupakan organ yang memiliki konsentrasi enzim glutathione peroksidase dan katalase yang cukup tinggi.

Glutathione terbentuk dari 3 asam amino yaitu glutamat, sistein, dan glisin. Gugus Sulfhidril pada glutathione berfungsi sebagai donor elektron, dan dioksidasi menjadi bentuk disulfida (GSSG) selama reaksi tersebut.¹² Sistem pertahanan yang diperantarai oleh GSH terhadap stress oksidatif sering ditemukan pada semua jenis sel, kebutuhan akan NADPH untuk mempertahankan kadar GSH tergantung pada jalur pentosa fosfat.¹³

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental secara *in vivo* dengan model hipoksia dengan kadar oksigen 8% terhadap hewan coba yang dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara dan analisa gas darah dan hematologi yang dilakukan di Laboratorium PK RSCM dengan waktu penelitian 18 bulan.

Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Sprague dawley* jantan yang sehat berumur 8-12 minggu dengan berat 180-250 gram.

Penetapan Jumlah Hewan Coba

Penetapan jumlah hewan coba menggunakan rumus Federer sehingga didapatkan untuk 7 kelompok perlakuan (1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 1 hari, 3 hari) dibutuhkan 4 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

Sampel ginjal yang telah diambil dari tikus percobaan dipotong menjadi ukuran-ukuran kecil kemudian ditimbang. PBS ditambahkan pada sampel dengan perbandingan 1:1 secara bertahap sampai halus menggunakan *tissue grinder (homogenizer)*. Setelah itu, homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Setelah selesai disentrifugasi, supernatan yang sudah terpisah dari pelet dapat diambil dan siap untuk digunakan.

Pengukuran Kadar GSH

Pengukuran menggunakan metoda Ellman¹⁴ dengan pemeriksaan duplo. Menggunakan 50 μL sampel ditambahkan 200 μL larutan trikloroasetat (TCA) 5% untuk deproteinisasi. Setelah itu dicampur dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan ditambahkan 25 μL ditiobisnitrobenzoat (DTNB) serta

jam, 12 jam, 1 hari, 3 hari) dibutuhkan 4 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

Pembuatan Homogenat Ginjal

1750 μL dapar fosfat pH 8,0. Kemudian dicampur dan diinkubasi pada suhu ruang tanpa cahaya selama 1 jam. Serapan warna kuning yang berasal dari tionitrobenzen (TNB) diukur pada λ 412nm.

Analisa Gas Darah dan Hematologi

Sampel darah diambil dari aorta dengan menggunakan *sputit* dan dipindahkan kedalam tabung yang mengandung anti-koagulan. Setelah terkumpul sekitar 2 ml darah, Selanjutnya darah dan antikoagulan dicampur dan segera dikirim untuk analisis gas darah dan pemeriksaan hematologi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa Gas Darah dan Hematologi

Pada tabel 1 terlihat penurunan dari komponen pH, pO_2 , pCO_2 , dan saturasi O_2 pada perlakuan hipoksia dibanding dengan kelompok

normoksia dari perlakuan 1 jam. Hal ini menandakan bahwa tikus mengalami hipoksia. Penurunan pH disertai penurunan HCO_3 menandakan bahwa tikus mengalami keadaan asidosis metabolik dengan kompensasi respiratorik karena terjadi penurunan pCO_2 .

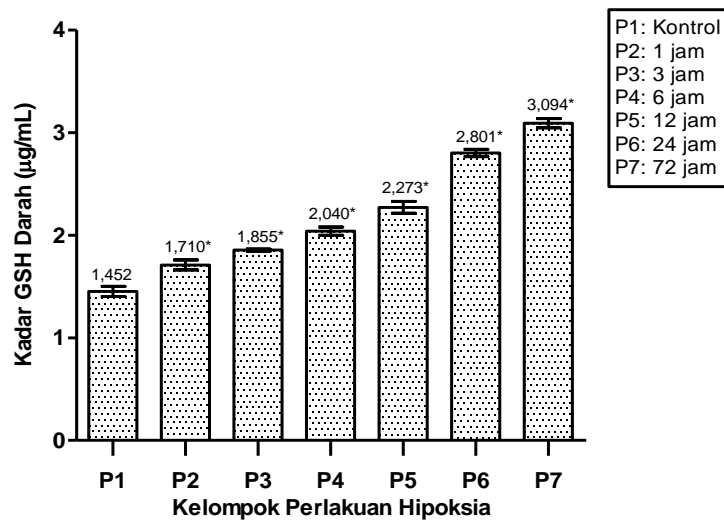
Dari hasil pemeriksaan hematologi yaitu eritrosit, Hb, dan Ht mengalami peningkatan yang diduga merupakan adaptasi sistemik melalui mekanisme regulasi HIF-1 α yang menginduksi transkripsi dan translasi gen eritropoetin.

Parameter	Normoksia	Hipoksia					
		1 jam	3 jam	6 jam	12 jam	24 jam	72 jam
pH	7.43 ± 0.02	7.43± 0.01	7.42 ± 0.01	7.41 ± 0.02	7.40 ± 0.01*	7.40 ± 0.03*	7.39 ± 0.02*
pCO₂, mmHg	40.7 ± 2.7	39.2± 2.2*	38.3± 2.2*	36.4 ± 3.3*	35.7 ± 2.4*	32.5 ± 3.6*	30.2 ± 3.4*
pO₂, mmHg	97.8 ± 4.8	87.2± 6.1*	72.3± 5.2*	68.6 ± 4*	57.3 ± 3.1*	53.1 ± 7.4*	48.7 ± 2.6*
HCO₃	24.8 ± 2.5	22.2± 2.3*	20.4± 1.7*	17.9 ± 1.2*	21.4 ± 1.1*	19.3 ± 2.8*	18.2 ± 2.1*
Sat O₂, %	95.8 ± 3.1	89.7± 6.2*	80.2± 5.5*	71.3 ± 5.4*	65.7 ± 8.6*	54.7 ± 8.6*	58.2 ± 5.4*
Hemoglobin, g/L	120.1 ± 1.6	120.7 ± 3.1	123.2 ± 3.7*	126.6 ± 5.5*	133.4 ± 3.9*	148.6 ± 4.4*	162.5 ± 5.2*
Hematokrit, %	45.2 ± 2.5	45.6± 3.6	47.1 ± 5.1*	48.3 ± 2.7*	51.2 ± 2.6*	53.4 ± 5.4*	55.8 ± 4.3*
SDM, /μL/1000	6.7 ± 0.1	6.8± 0.2	7.0 ± 0.2	7.2 ± 0.5*	7.8 ± 0.5*	8.15 ±0.4*	8.3 ± 0.8*

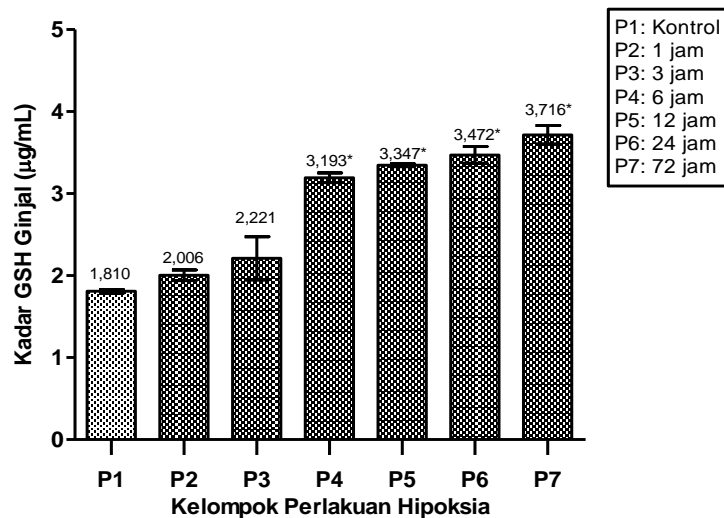
Kadar GSH Darah dan Ginjal

Pada grafik (gambar 1) terlihat peningkatan kadar GSH pada darah yang bermakna pada perlakuan hipoksia 1 jam ($p < 0,005$). Sama halnya dengan kadar GSH pada darah, kadar GSH pada ginjal juga mengalami peningkatan secara bertahap sejalan dengan lamanya

hipoksia dan mengalami kadar puncak pada perlakuan 3 hari (P7) seperti yang terlihat pada grafik (gambar 2). Hal ini diduga merupakan mekanisme kompensasi untuk mencegah terjadinya kerusakan oksidatif yang bisa menimbulkan kerusakan pada sel-sel ginjal.



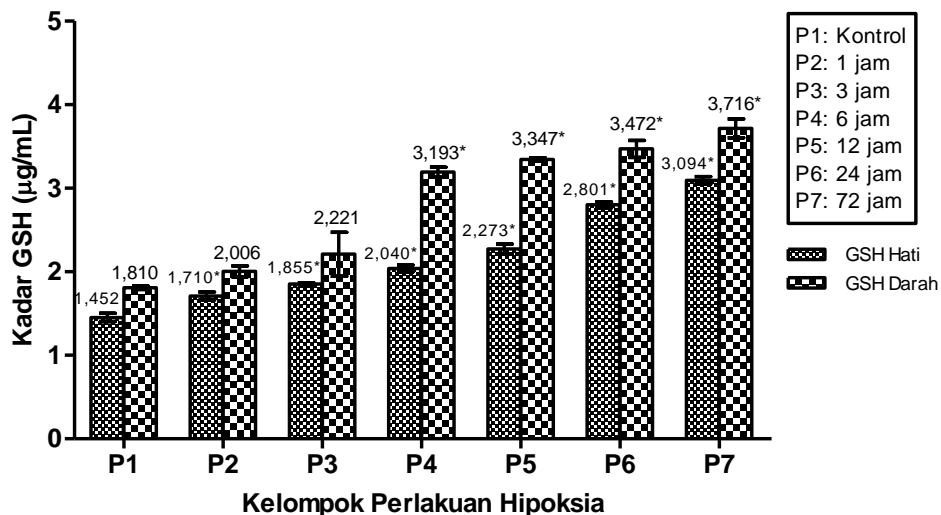
Gambar 1 Kadar GSH darah



Gambar 2 Kadar GSH Ginjal

Peningkatan kadar GSH ginjal tidak bermakna pada perlakuan hipoksia 1 jam (P2). Hal ini diduga karena akumulasi ROS di dalam sel yang masih sedikit, sehingga GSH yang diproduksi juga belum terlalu banyak. Peningkatan yang bermakna baru terjadi pada perlakuan hipoksia 6 jam (P4), hal ini diduga karena paparan hipoksia yang lebih lama menyebabkan akumulasi ROS yang lebih banyak. Hal ini sejalan dengan penelitian Asni E *et al*¹⁵ yang menyatakan peningkatan ROS tidak langsung menimbulkan kondisi stres oksidatif, dan anti oksidan akan berperan menjaga keseimbangan terhadap pro oksidan.

Uji korelasi antara kadar GSH ginjal dan darah menunjukkan hasil korelasi bermakna ($p=0,0046$) dan didapatkan korelasi positif kuat ($r = 0,9089$). Hal ini menunjukkan peningkatan kadar GSH pada ginjal juga akan meningkatkan kadar GSH pada darah. Kadar GSH pada ginjal yang lebih tinggi daripada di darah merupakan hal yang normal. Hal ini disebabkan karena GSH pada ginjal yang diukur merupakan hasil dari produksi GSH pada ginjal, sedangkan pada kadar GSH pada darah diduga merupakan kebocoran dari organ yang dilaluinya selama sirkulasi.



Gambar 3 Perbandingan Kadar GSH Darah dan Ginjal

DAFTAR PUSTAKA

1. Hendrawan S. Ekspresi Gen Hypoxia Inducible Factor - 1α (HIF- 1α) dan Apoptosis Pada Jantung Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2008.
2. Giordano FJ. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, And Heart Failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):500-8.
3. Zainuri M, Wanandi SI. Aktivitas Spesifik Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Dan Katalase Pada Hati Tikus Yang Diinduksi Hipoksia Sistemik : Hubungannya Dengan Kerusakan Oksidatif. Jakarta : Media Litbang Kesehatan. 2012; 22(2):87-92.
4. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica.* 2004;51(3):563-85.
5. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2008;17(12):3298-305.
6. Colucci WS. Apoptosis In The Heart [review]. Boston: Boston Medical Center; 2003.
7. O'Connor PM. Renal Oxygen Delivery : Matching Delivery To Metabolic Demand. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2006;33(10):961-7.
8. Navar LG, Carmines PK, Paul RV. Renal circulation. In: Massry SG, Glassock RJ, editors. *Textbook of nephrology.* 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins;1989:43-147.
9. Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS, et al. Role Of Hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl.* 2005;(99):46-51.
10. Zhang W, Edwards A : Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):1042–55.
11. Schurek HJ, Jost U, Baumgartl H, Bertram H, Heckmann U : Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *Am J Physiol.* 1990;259(6): 910–915.
12. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwel V. *Biokimia harper.* 24th Ed. Jakarta: EGC; 1999.
13. Marks DB, Marks AD, Smith CM. *Biokimia Kedokteran Dasar : Sebuah Pendekatan Klinis.* Jakarta: EGC; 2000.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch of Bioch & Biophys.* 1959; 82(1): 70-77.
15. Asni E, Harahap IP, Prijanti AR, Wanandi IS, Jusman SWA, Sadikin M. Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan Terhadap Kadar Malondialdehid, Glutation Tereduksi Dan Aktivitas Katalase Ginjal Tikus. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 2009; 9(12): 595-600.