

Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap kadar Malondialdehid (MDA) pada darah dan jaringan ginjal tikus Sprague Dawley

Cinthia Catherine¹, Frans Ferdinal^{2,*}

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

² Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

*korespondensi email: fransf@fk.untar.ac.id

ABSTRAK

Hipoksia sistemik adalah keadaan yang disebabkan berkurangnya asupan oksigen secara sistemik dalam jangka waktu lama. Keadaan ini dapat menyebabkan stres oksidatif yang berakibat pada kerusakan sel dalam berbagai jaringan. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan oksidatif lipid yang dapat dideteksi dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA). Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat apakah terdapat peningkatan kadar MDA dalam darah dan ginjal tikus akibat hipoksia sistemik. Hewan coba dibagi menjadi 7 kelompok ($n = 4$ per kelompok) yaitu P1 (normoksia) dan P2 s/d P7 (hipoksia). Kelompok hipoksia ditempatkan didalam sungkup hipoksia selama 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam dan 72 jam. Setelah perlakuan terjadi peningkatan bermakna dari kadar MDA dalam darah dan ginjal secara bertahap sejalan dengan lamanya hipoksia. Dapat juga digunakan parameter stress oksidatif lain untuk melihat kerusakan sel seperti glutation, enzim katalase, dan lain-lain.

Kata kunci: Hipoksia, stress oksidatif, MDA

PENDAHULUAN

Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen didalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel, dapat mengakibatkan cedera sel seperti stress oksidatif yang dapat menyebabkan gangguan fungsi organ. Hipoksia dapat menyebabkan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) oleh mitokondria.¹ ROS adalah oksidan yang reaktif dan mempunyai dampak negative yaitu merusak komponen sel. Sel memiliki pertahanan terhadap serangan dari ROS dalam bentuk enzim antioksidan.² Antioksidan merupakan agen protektif yang menginaktivasi ROS

dan menunda kerusakan oksidatif. Antioksidan didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil.³ Di dalam tubuh, radikal bebas dapat menyebabkan proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid adalah perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA). Dengan demikian, MDA dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh. Tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh

meningkatkan aktivitas radikal bebas.⁴ MDA dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti ROS bereaksi dengan komponen asam lemak dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak tersebut akan menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik dan menyebabkan kerusakan pada membran sel.⁵

Ginjal merupakan salah satu organ yang penting. Aliran darah dari jantung ke ginjal dialirkan 20% digunakan sebagai pompa Na^+ K^+ ATPase dan mengekskresi zat-zat yang tidak diperlukan dalam tubuh. Jika salah satu fungsi ginjal terganggu, dapat menyebabkan kerusakan ginjal.

METODE PENELITIAN

Studi ini merupakan studi eksperimen *in vivo* yang dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler dari Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara dan Laboratorium Patologi Klinik RSCM dengan waktu studi pada bulan April - Mei 2015. Pada studi ini tikus diberi perlakuan hipoksia didalam *hypoxic chamber* dengan konsentrasi oksigen 8% nitrogen 92%.

Studi ini menggunakan tikus *Sprague dawley* jantan yang sehat berumur 8-12 minggu dengan berat badan 180-250 gram. Penetapan jumlah ulangan sampel tikus pada tiap kelompok dilakukan berdasarkan rumus Federer. Tikus dibagi menjadi tujuh kelompok, kelompok hipoksia (1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 72 jam) dan kelompok kontrol (normoksia).⁶

Pembuatan Homogenat Ginjal

Sampel jaringan ginjal yang telah diambil ditimbang 200 mg masing-masing dari tikus percobaan dan dipotong menjadi ukuran-ukuran kecil. Kemudian dibuat homogenat dengan menambahkan dapar fosfat pH 7,2 pada sampel dengan perbandingan sampel : dapar fosfat = 1:1 secara bertahap sambil sampel terus dihaluskan menggunakan *tissue grinder* (*homogenizer*). Setelah itu, homogenat yang telah dibuat disentrifugasi menggunakan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dengan pelet (struktur-struktur lebih besar yang setelah disentrifugasi akan mengendap dibawah tabung *sentrifuge*). Setelah selesai disentrifugasi, supernatan yang sudah terpisah dari pelet dapat diambil dan siap untuk digunakan.

Pengukuran Kadar MDA Ginjal

Untuk pengukuran kadar MDA, digunakan uji TBA dengan metode Wills

ED⁷ secara duplo. Setiap tabung uji berisikan sample (supernatan dari homogenate yang disentrifugasi). Masing-masing tabung uji akan dilakukan penambahan 400 μ L TCA dengan tujuan mengendapkan protein. Tabung kemudian divortex hingga homogen dan disentrifugasi. Supernatan diambil dan ditambahkan 800 μ L TBA 0,67%. Semua tabung inkubasi pada suhu 96-100°C selama sepuluh menit agar molekul TBA dapat bereaksi dengan MDA, lalu dinginkan di air dengan suhu ruangan. Setelah itu dilakukan pengukuran absorban dengan menggunakan UV *Spectrophotometer* pada panjang gelombang 530nm. Absorban yang didapat digunakan untuk menghitung konsentrasi MDA, yang dinyatakan dalam satuan nmol/mL. Untuk pembuatan standard menggunakan larutan TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) 1:80.000 merupakan prekursor dari MDA.

Analisis Gas Darah dan Pemeriksaan Hematologi

Sampel darah dari kelompok perlakuan (P2 s/d P7) diambil pada setiap akhir masa perlakuan, sedangkan untuk kelompok kontrol (P1) pengambilan sampel dilakukan pada hari ke 3. Darah diambil dengan menggunakan semprit gelas yang sudah mengandung 0.1 ml natrium-heparin untuk setiap 1 ml darah,

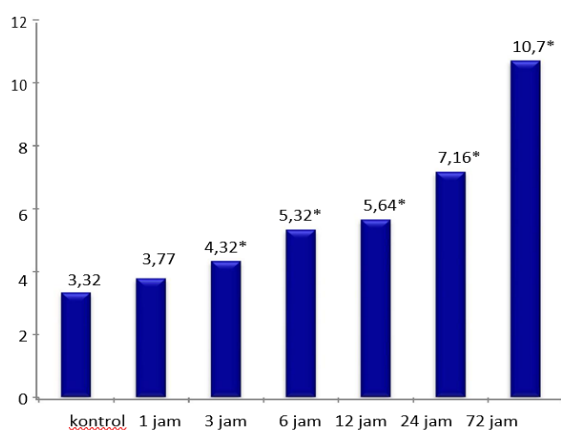
sebagai antikoagulan. Setelah terkumpul sekitar 2 ml darah, jarum ditarik dari pembuluh darah dan ujung jarum segera ditutup, setelah sisa gelembung udara dikeluarkan. Selanjutnya darah dan antikoagulan dicampur dengan hati-hati dan segera dikirim untuk analisis gas darah dan pemeriksaan hematologi. Parameter dari gas darah yang akan diukur adalah pH, bikarbonat (HCO₃⁻), pCO₂, pO₂, dan SatO₂. Semua parameter tersebut diperiksa secara automasi dengan *blood gas analyzer*. Pada pemeriksaan hematologi, yang akan diperiksa adalah hitung sel darah merah (SDM), hemoglobin dan hematokrit.

HASIL PENELITIAN

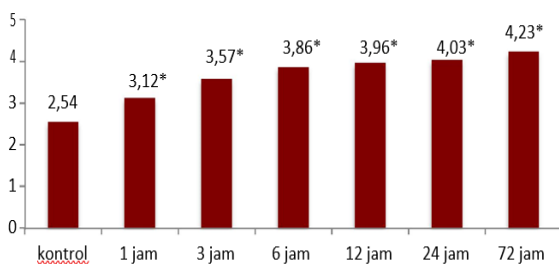
Pada gambar 1 terlihat kadar MDA ginjal mengalami peningkatan secara bertahap sejalan dengan lamanya hipoksia dan mengalami kadar puncak pada perlakuan 72 jam (P7). Peningkatan yang bermakna terjadi dari perlakuan 3 jam hipoksia (P3). Peningkatan kadar MDA pada perlakuan hipoksia 1 jam belum bermakna mungkin disebabkan oleh adanya mekanisme kompensasi oleh sel-sel ginjal dalam pembentukan ROS. Pada saat perlakuan 3 jam telah terjadi peningkatan ROS yang lebih banyak dan menyebabkan sel-sel ginjal mengalami kerusakan yang lebih

berat sehingga kadar MDA meningkat secara bermakna.

Kadar MDA darah pada semua kelompok yang diberi perlakuan hipoksia mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan terjadi sejak perlakuan 1 jam (P2) hingga perlakuan 3 hari (P7). Peningkatan kadar MDA bermakna terlihat pada hipoksia 1 jam (terlihat pada gambar 2). Peningkatan kadar MDA terjadi karena adanya peningkatan ROS yang berlebih pada jaringan sehingga terjadi kebocoran pada sel dan kadar MDA dikeluarkan ke darah.



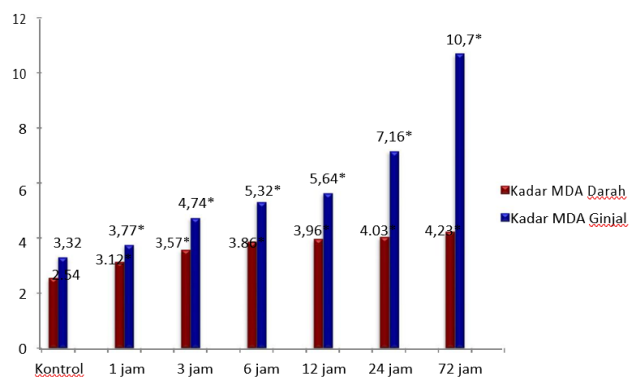
Gambar 1. Konsentrasi MDA pada ginjal Tikus *Sprague dawley*, *perbedaan bermakna dibanding normoksia ($P < 0.05$, uji Mann Whitney)



Gambar 2. Konsentrasi MDA pada darah Tikus *Sprague dawley*, *perbedaan bermakna dibanding normoksia ($P < 0.05$, uji Mann Whitney)

Pada uji statistik menggunakan Pearson Corellation Test pada kadar MDA darah dan ginjal, terdapat korelasi yang bermakna ($p = 0,0353$) serta korelasi positif kuat ($r = 0,7881$), hal ini karena stress oksidatif meningkatkan kadar MDA pada ginjal dan semakin banyak kadar MDA di ginjal maka semakin banyak juga yang dikeluarkan ke dalam darah.

Dilakukan uji statistik menggunakan Pearson Corellation Test pada kadar MDA darah dengan tekanan O_2 ($r = -0,9766$) dan kadar MDA ginjal dengan tekanan O_2 ($r = -0,8418$). Uji statistik memperlihatkan hasil korelasi negatif, hal ini menunjukkan semakin rendah tekanan O_2 maka semakin tinggi kadar MDA. Korelasi ini terjadi karena keadaan hipoksia menyebabkan penurunan oksigen yang dapat mengakibatkan kerusakan stres oksidatif berupa peningkatan kadar MDA baik pada darah maupun pada ginjal.



Gambar 3. Perbedaan Kadar MDA Darah dan Ginjal. Uji korelasi pearson menunjukkan korelasi positif kuat (pearson, $p < 0,0001$, $r = 0,7881$)

PEMBAHASAN

Kondisi hipoksia dapat dilihat dari hasil analisis gas darah. Semakin lama durasi paparan akan menimbulkan perubahan yang makin besar pada hasil analisis gas darah. Tekanan O₂ pada arteri, tekanan CO₂ dan saturasi O₂ menunjukkan penurunan sejak P2 karena adanya stress metabolik sebagai akibat dari hipoksia sistemik kronik dan suplai oksigen yang berkurang. Penurunan pH yang bermakna baru terjadi pada perlakuan hipoksia 12 jam (P5) dan terus menurun hingga akhir perlakuan. Pada kadar HCO₃ juga terlihat penurunan yang secara berangsur-angsur sejak perlakuan 1 jam karena metabolisme pada keadaan hipoksia sifatnya lebih asam yang mengakibatkan perubahan pH dan HCO₃. Di sisi lain, parameter hematologi, Hb, Ht dan SDM naik secara bermakna sejak awal perlakuan. Hal ini terjadi sebagai usaha kompensasi terhadap penurunan pO₂ di jaringan dan sel, agar suplai oksigen yang sampai ke dalam sel dapat ditingkatkan dan kadar oksigen kembali normal. Peningkatan parameter hematologi juga karena peranan protein HIF-1 α sebagai pengaturan homeostasis oksigen melalui peningkatan transkripsi gen tertentu. Penurunan saturasi O₂ sesuai dengan penurunan pO₂. Rendahnya nilai saturasi O₂ pada akhir perlakuan menunjukkan

bahwa pada saat itu hewan mengalami hipoksia karena penurunan saturasi O₂ merupakan indikator hipoksia.

KESIMPULAN

Hipoksia sistemik kronik dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA darah dan ginjal tikus. Terdapat korelasi bermakna antara peningkatan kadar MDA darah dan ginjal tikus yang diinduksi hipoksia sistemik kronik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ganong M.D. Penyesuaian Pernafasan Pada Orang Sehat dan Sakit. Dalam: Novrianti A et all, editor. Fisiologi Kedokteran. Edisi 10. Jakarta: EGC;2007. hal.586-97.
2. Ferdinal F. Model gagal jantung eksperimental pada tikus yang diinduksi hipoksia kronik dan perubahan ekspresi gen BNP-45 pada tingkat translasi. Ebers Papyrus. 2009;15(9):hal.9
3. Guyton. Pengangkutan Oksigen dan Karbondioksida di dalam Darah dan Cairan Tubuh. Dalam: Widjajakusumah D, Tanzil A, editor. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 7. Jakarta: EGC; 2008. hal.181-207.
4. Yustika A, Prasetyawan S. Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cylosporine-A. Kimia Student Journal. 2013;1(2):hal.222-28.
5. Yunus, Moch. Pengaruh Antioksidan Vitamin C Terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik. Jurnal Pendidikan Jasmani. 2013(1):hal.9-16.
6. Federer, WT. Experimental Design: Theory and Application. New York, The Macmillan Co, 1995.
7. Wills ED. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullock B, editors. Biochemical toxicology: A practical approach. Oxford: IRL;1987:127-52.