

Pengaruh hipoksia sistemik terhadap kadar Glutation (GSH) pada jantung dan darah tikus Sprague Dawley

William Lukman¹, 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: franf@fk.untar.ac.id

ABSTRAK

Hipoksia adalah kondisi kekurangan oksigen pada sel. Jantung merupakan organ yang aerobik obligat. Hipoksia bukan hanya terjadi karena konsekuensi global pada tekanan oksigen yang rendah, tapi juga terjadi pada keadaan inflamasi, cedera dan iskemik jaringan, serta pertumbuhan tumor. Hipoksia diketahui meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) pada intraseluler. Kelebihan produksi ROS dibanding pertahanan antioksidan yang disebut stres oksidatif diketahui berperan penting pada patofisiologi gagal jantung. Antioksidan seluler penting untuk memproteksi sel melawan ROS. Salah satunya adalah Glutation (GSH) yang merupakan antioksidan penting yang bertanggungjawab untuk menjaga homeostasis redoks intraseluler. Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai perubahan kadar GSH pada jantung dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Hewan coba tikus dibagi menjadi 7 kelompok ($n = 4$ per kelompok): kelompok kontrol normoksia, kelompok hipoksia yang ditempatkan dalam sungkup hipoksik (kadar O_2 8%) selama 1,3,6,12,24, dan 72 jam. Hasil : kenaikan konsentrasi kadar GSH pada jantung dan darah tikus yang mengalami perlakuan hipoksia dibandingkan normoksia. Hipoksia sistemik menyebabkan kenaikan kadar GSH pada jantung dan darah tikus. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap hipoksia sistemik yang lebih lama dari 72 jam dan variabel-variabel lain yang dipengaruhi hipoksia sistemik seperti malondialdehid, enzim katalase, HIF.

Kata kunci: Hipoksia, jantung, darah, Glutation

PENDAHULUAN

Oksigen merupakan molekul yang sangat esensial untuk lingkungan dan perkembangan organisme multiseluler, merupakan akseptor terakhir dari elektron dalam rantai transpor elektron, dimana bila oksigen tidak mencukupi maka dapat terjadi deplesi ATP. Jantung adalah organ aerobik obligat yang membutuhkan energi yang tinggi untuk memelihara proses seluler istimewa termasuk transpor ion dan homeostasis ion Ca^{2+} . dalam keadaan anaerobik, jantung tidak dapat menjaga proses seluler yang penting, sehingga pasokan oksigen yang cukup sangat

dibutuhkan jantung dalam menopang fungsi dan viabilitas jantung.^{1,2,3} Hipoksia adalah kondisi kekurangan oksigen pada sel, terjadi bukan hanya karena konsekuensi global pada tekanan oksigen yang rendah, juga terjadi pada keadaan inflamasi, cedera dan iskemik jaringan, serta pertumbuhan tumor.^{4,5} Hipoksia meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) pada intraseluler. ROS menyebabkan kerusakan kompleks transport electron, menimbulkan siklus umpan balik positif selama hipoksia, dimana peningkatan toksisitas ROS merusak rantai pernapasan yang berujung pada penambahan produksi ROS, dan terjadi disfungsi pernapasan.^{6,7} ROS menyebabkan oksidasi pada membran

lipid, protein, dan DNA mencakup lingkup luas pada kondisi cedera reperfusi iskemik, penyakit degeneratif saraf dan penuaan. Efek toksik ROS dapat dicegah dengan enzim seperti superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GSHPx), katalase, dan antioksidan non enzimatis lain.^{8,9} Kelebihan produksi ROS disbanding pertahanan antioksidan yang disebut stres oksidatif diketahui berperan penting pada patofisiologi gagal jantung.¹⁰

Antioksidan selular penting untuk memproteksi sel melawan ROS. Salah satunya adalah Glutathione (GSH) yang merupakan antioksidan penting yang bertanggungjawab untuk menjaga homeostasis redoks intraseluler. Sebagai contoh, hidrogen peroksidase yang terbentuk dalam keadaan stress oksidatif direduksi oleh glutathione peroksidase dengan konversi yang bersamaan dengan glutathione tereduksi ke bentuk yang dioksidasi.^{12,13}

Studi ini bertujuan mengukur kadar glutathione (GSH) dalam jantung dan darah pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik, serta mengetahui korelasi antara kadar glutathione (GSH) pada jantung dan darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.

METODE PENELITIAN

Studi ini merupakan penelitian eksperimental in vivo model hipoksia pada tikus jantan *Sprague dawley* jantan yang

berumur 10 – 12 minggu dengan berat 180-220 gram. Tikus diperlakukan sesuai kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol (tanpa perlakuan), selanjutnya disebut P1. Enam kelompok lainnya, adalah kelompok perlakuan yang dipaparkan pada hipoksia, disebut kelompok P2-P7.

Sampel diperoleh dari jantung tikus *Sprague dawley* pada kelompok kontrol dan kelompok yang diinduksi hipoksia sistemik selama 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, dan 72 jam. Jumlah hewan coba tiap kelompok sebanyak 4 ekor. Maka jumlah hewan coba adalah 28 tikus *Sprague dawley* yang terbagi menjadi 7 kelompok: (1) Kelompok tikus kondisi normal sebagai kontrol, (2) kelompok tikus dengan hipoksia selama 1 jam, (3) kelompok tikus dengan hipoksia selama 3 jam, (4) kelompok tikus dengan hipoksia selama 6 jam, (5) kelompok tikus dengan hipoksia selama 12 jam, (6) kelompok tikus dengan hipoksia selama 24 jam, dan (7) kelompok tikus dengan hipoksia selama 72 jam.

Enam kelompok perlakuan (P2-P7) secara berurutan dipaparkan pada hipoksia, masing-masing selama 1, 3, 6, 12, 24 dan 72 jam di dalam sungkup hipoksia. Tikus ditempatkan tiap kelompok ke dalam sungkup hipoksia yang kedap udara

(Gambar 3.1). Sungkup hipoksia dihubungkan dengan tangki gas yang mengandung campuran gas 8% oksigen dan 92% nitrogen. Tangki gas tersebut merupakan satu-satunya sumber udara ke dalam sungkup. Bagian atas sungkup yang berbentuk kubah dihubungkan dengan oksigen meter sehingga kadar oksigen dalam sungkup dapat dipantau. Di dalam sungkup terdapat kipas agar terjadi sirkulasi udara. Udara ekspirasi yang mengandung CO₂ dialirkan keluar melalui suatu pipa karet ke dalam suatu botol sampai terendam larutan kalsium karbonat jenuh (*soda lime*) yang terdapat dalam botol tersebut, selanjutnya botol tersebut dihubungkannya dengan udara luar lewat suatu pipa.

Pada akhir masa perlakuan, satu per satu tikus dikeluarkan dari sungkup dan ditimbang dengan cepat. Selanjutnya tikus tersebut dipindahkan ke dalam sungkup kecil, yang sudah dioptimasi sebelumnya. Dalam sungkup tersebut tikus dikorbankan dengan menggunakan eter. Dalam kondisi anestesi rongga dada dibuka dengan melakukan potongan pada midsternum untuk mengambil sampel jantung, dan pengambilan darah dari aorta menggunakan spuit berukuran kecil. Setelah dikeluarkan dari rongga dada, jantung dibuat homogenat untuk diperiksa kadar glutathionnya. Sisa tubuh yang tidak

digunakan akan dijahit kembali dan dikubur. Organ jantung ditimbang terlebih dahulu. Setelah ditimbang 0.1 gram organ jantung tersebut dimasukan ke dalam test tube. Mempersiapkan *homogenizer*. Dimasukkan dapar fosfat pH 7 ke dalam test tube hingga mencapai volume 1 ml sambil diputar pada *pestle homogenizer*. Sambil diputar pada *pestle homogenizer*, test tube yang berisi sample tersebut dicelupkan ke dalam air es. Di-*homogenizer* hingga halus. Setelah halus, homogenat tersebut dimasukkan ke dalam mesin sentrifugasi untuk diambil supernatannya. Pemutaran pada mesin sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan disimpan untuk pemeriksaan selanjutnya.

Parameter yang diperiksa dan diamati pada penelitian ini adalah kadar glutathion pada jantung dan darah tikus *Sprague dawley*. Kadar glutathion diperiksa dengan metode Ellman¹⁴. Untuk pengukuran kadar glutathion pada jantung dan darah tikus *Sprague dawley* digunakan 50µL supernatan (darah sudah dalam keadaan supernatant). Setelah itu ditambahkan TCA 5% sebanyak 200µL untuk mengendapkan protein dan divortex. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dan supernatan diambil dan ditambahkan 25 µL DTNB dan ditambahkan dapar fosfat pH 8

sebanyak 1750 μ L dan didiamkan selama 1jam. Reaksi antara DNTB dengan glutation menghasilkan tionitrobenzen (TNB) yang berwarna kuning dengan GSSG.¹⁴ Kemudian serapan absorban diukur dengan spektrofotometer pada λ 412 nm dan dibandingkan dengan serapan larutan standar glutation dengan kadar 1, 2, 4, 5, 10.

HASIL PENELITIAN

Data nilai gas darah dan hematologi dimasukkan dalam Tabel 1. Tabel ini menunjukkan perubahan parameter gas

darah dan hematologi dalam bentuk rerata $\pm$ standar of mean (SEM). perbedaan nilai parameter gas darah dan hematologi diantara normoksia dan hipoksia diuji dengan uji statistik Mann Whitney.)

Berdasarkan uji statistik Mann whitney pada kadar GSH jantung tidak terdapat hubungan bermakna antara perlakuan kontrol dengan kelompok perlakuan hipoksia 1 jam, 3 jam, dan 6 jam. Namun terdapat hubungan bermakna ($p < 0.05$) antara kontrol dengan kelompok perlakuan hipoksia 12 jam, 24 jam, dan 72 jam.

Tabel 1. Nilai Gas Darah dan Hematologi

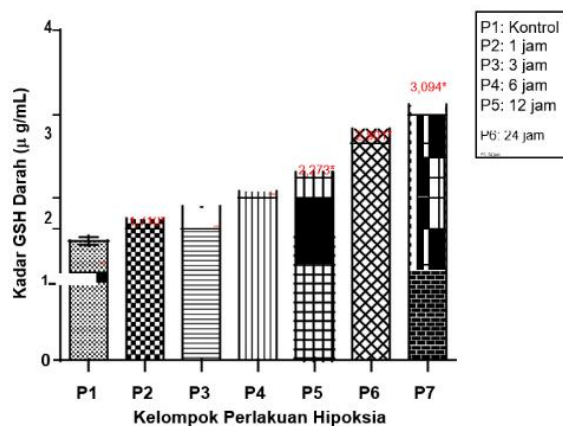
Parameter	Normoksia	Hipoksia					
		1 jam	3 jam	6 jam	12 jam	24 jam	72 jam
pH	7.43 $\pm$ 0.02	7.43 $\pm$ 0.01	7.42 $\pm$ 0.01	7.41 $\pm$ 0.02	7.40 $\pm$ 0.01*	7.40 $\pm$ 0.03 *	7.39 $\pm$ 0.02*
pCO₂ (mmHg)	40.7 $\pm$ 2.7	39.2 $\pm$ 2.2*	38.3 $\pm$ 2.2*	36.4 $\pm$ 3.3*	35.7 $\pm$ 2.4*	32.5 $\pm$ 3.6*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

Catatan: Nilai rerata $\pm$ SEM, *perbedaan bermakna dibanding normoksia ($P < 0.05$, uji Mann Whitney)

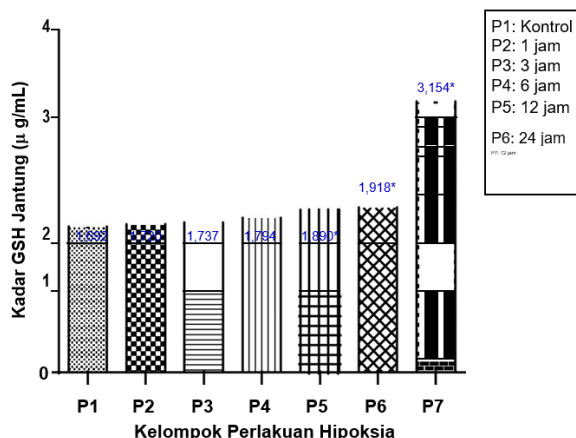
Dari gambar 1, terlihat bahwa terdapat peningkatan kadar GSH selama perlakuan hipoksia. Peningkatan kadar GSH ini dinyatakan bermakna antara control

dengan kelompok perlakuan hipoksia 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, dan 72 jam berdasarkan uji statistik Mann Whitney yang dicantumkan. Pada gambar

2 menunjukkan konsentrasi GSH pada jantung dan tikus *Sprague dawley*. Pada uji statistik korelasi pearson menunjukkan adanya korelasi positif yang bermakna ($p=0.03, r=0.78$) antara kadar GSH pada jantung dan tikus *Sprague dawley*.



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



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

PEMBAHASAN

Pada studi ini didapatkan penurunan bermakna pada pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3 dan Saturasi O_2 antara perlakuan hipoksia dan normoksia. Perubahan parameter gas darah ini menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan menyebabkan hipoksia sistemik pada tikus *Sprague dawley*. Pada studi yang dilakukan Witt et al¹⁵ didapatkan perlakuan hipoksia dapat menurunkan parameter gas darah secara bermakna. Penurunan yang bermakna pada pO_2 terjadi sejak perlakuan hipoksia 1 jam sampai 72 jam secara berangsur. Penurunan pO_2 selama hipoksia juga dilaporkan pada studi Johnson et al¹⁶. Saturasi O_2 terlihat menurun selama perlakuan hipoksia 1 jam sampai 24 jam. Penurunan saturasi O_2 ini bermakna secara statistik. Johnson et al¹⁶ menemukan bahwa penurunan saturasi O_2 arteri sebanyak 40% terjadi selama perlakuan 1 menit hipoksia. Perbedaan saturasi O_2 akan semakin bertambah selama perlakuan hipoksia. Pada perlakuan hipoksia 72 jam terdapat penurunan bermakna dibanding normoksia, namun nilai saturasi O_2 perlakuan hipoksia 72 jam cenderung lebih tinggi dibanding perlakuan hipoksia 24 jam. Peneliti mengasumsikan bahwa kenaikan saturasi O_2 ini disebabkan karena adanya peningkatan kadar

hemoglobin selama perlakuan hipoksia. Kadar hemoglobin dan hematocrit mengalami kenaikan secara berangsur yang bermakna selama perlakuan hipoksia 3 jam sampai dengan 72 jam. Kenaikan yang bermakna secara berangsur juga dialami oleh jumlah sel darah merah selama perlakuan hipoksia 6 jam sampai 72 jam. Kenaikan parameter-parameter ini juga didapatkan pada penelitian Ferdinal F 17 yang menyatakan bahwa kenaikan hematokrit dan sel darah merah sebagai akibat upregulation gen EPO (eritropoetin) oleh HIF-1. Penurunan bermakna secara berangsur terjadi pada pCO_2 pada perlakuan hipoksia 1 jam sampai 72 jam. Penurunan pCO_2 selama hipoksia terjadi karena adanya hiperventilasi sebagai kompensasi hipoksia. Kadar pH mengalami penurunan secara berangsur yang bermakna selama perlakuan hipoksia 12 jam sampai 72 jam. Penurunan ini memperlihatkan terjadinya asidosis. Kadar HCO_3 pada perlakuan hipoksia terlihat menurun dibandingkan dengan normoksia. Penurunan pH disertai penurunan HCO_3 memperlihatkan relatif asidosis metabolik yang dikompensasi dengan penurunan pCO_2 .¹⁸ Konsentrasi GSH pada jantung dan darah mengalami kenaikan mulai dari hipoksia 1 jam bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kenaikan konsentrasi GSH yang terjadi menunjukkan adanya upaya kompensasi tubuh terhadap keadaan hipoksia. Kenaikan kadar GSH pada perlakuan hipoksia juga ditemukan pada penelitian Asni et al¹⁹. Pada penelitian Asni et al¹⁹ menyatakan bahwa pembentukan radikal oksigen akibat hipoksia berkelanjutan dapat dikompensasi oleh pembentukan antioksidan intraseluler seperti GSH. Pada penelitian yang dilakukan oleh Oh C et al²⁰ disimpulkan bahwa peningkatan glutathion pada hati janin guinea pig melalui upregulation γ GCS (glutamyl cysteine synthase) mungkin merupakan respon adaptif yang penting pada keadaan stress hipoksik.

Kenaikan kadar GSH yang bermakna pada jantung terjadi pada perlakuan hipoksia 12, 24, dan 72 jam. Peningkatan kadar GSH memperlihatkan bahwa jantung memiliki adaptasi terhadap keadaan hipoksia. Honcar OO dan Mankovska IM²¹ mengemukakan peningkatan GSH dan enzim yang berhubungan dengan kerja GSH pada jantung memperlihatkan adaptasi terhadap eksposisi hipoksia. Konsentrasi kadar GSH yang naik secara bermakna pada darah tikus sejak perlakuan hipoksia 1 jam sampai 72 jam memperlihatkan adanya proses adaptasi terhadap keadaan hipoksia pada darah tikus. Kenaikan

konsentrasi GSH pada darah disebabkan karena adanya GSH yang berasal dari kebocoran sel. Korelasi negatif antara pO_2 dengan konsentrasi GSH pada darah tikus menunjukkan bahwa semakin rendah pO_2 pada darah maka konsentrasi GSH pada darah akan semakin meningkat.

Pada uji statistik korelasi pearson menunjukkan adanya korelasi positif antara konsentrasi GSH pada darah dengan konsentrasi GSH pada jantung tikus. Korelasi positif ini menunjukkan bahwa darah dan jantung mempunyai system adaptasi yang sama terhadap hipoksia.

KESIMPULAN

Terdapat kenaikan kadar glutathion pada jantung tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Terdapat kenaikan kadar glutathion pada darah tikus yang diinduksi hipoksia sistemik. Terdapat korelasi antara peningkatan kadar GSH pada darah dan jantung tikus yang diinduksi hipoksia sistemik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*. 2004;18:2183-94.
2. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115:500-8.
3. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest*. 2005;115:547-55.
4. Sherwood L. Fisiologi Manusia. Edisi 6. Jakarta: penerbit buku kedokteran EGC; 2009.
5. Loscalzo J. The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3815-17.
6. Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:31153-62.
7. Korge P, Ping P, Weiss JN. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation modulation by nitric oxide. *Circulation research*. 2008;103:873-80.
8. Tsutsui H. Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Internal medicine*. 2006;45(13):809-13.
9. Sawyer DB, Colucci WS. Mitochondrial oxidative stress in heart failure "oxygen wastage" revisited. *Circulation research*. 2000;86:119-20.
10. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushimas S. Oxidative stress and heart failure. *Am J physiol heart circ physiol*. 2011;2181-90.
11. Ogunrinu TA, Sontheimer H. Hypoxia increases the dependence of glioma cells on glutathione. *J. Biol.Chem*. 2010;285:37716-24.
12. Mansfield KD, Simon MC, Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2004:1358-66.
13. Halliwill JR, Minson CT. Effect of hypoxia on arteriolar baroreflex control of heart rate and muscle sympathetic nerve activity in humans. 2002;93:857-64.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and Biophysics*. 1959;82:70-7

15. Witt KA, Mark KS, Hom Sharon, Davis TP. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:2820-31.
16. Johnson PC, Vandegriff K, Tsai AG, Intaglietta M. Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. *Japplphysiol.* 2005 apr;98(4);1177-84.
17. 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. Disertasi. Jakarta; Universitas Indonesia; 2009.
18. McPherson, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory method. 22th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
19. Asni E, Harahap PH, Prijanti AR, Wanandi SI, Jusman SWA, Sadikin M. Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan terhadap Kadar Malondialdehid, Glutathione Tereduksi dan Aktivitas katalase Ginjal Tikus. *Maj Ked Ind*; 2009;59 (12):595-600.
20. Oh C, Dong Y, Harman C, Mighty HE, Kopelman J, Thompson LP et al. Chronic hypoxia differentially increases glutathione content and γ -glutamyl cysteine synthetase expression in fetal guinea pig organs. *Earthumdev.* 2008;28:121-7.
21. Honchar OO, Manukovskaya IM. [Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training]. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2007;79(3):79-8