



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS EKSPRESI SITOGLOBIN DAN KAITANNYA
DENGAN STRES OKSIDATIF PADA DARAH DAN
JARINGAN OTAK PENDERITA STROK HEMORAGIK**

TESIS

**RATNAYANI
1106106123**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BOKIMIA
JAKARTA
DESEMBER 2013**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS EKSPRESI SITOGLOBIN DAN KAITANNYA
DENGAN STRES OKSIDATIF PADA DARAH DAN
JARINGAN OTAK PENDERITA STROK HEMORAGIK**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister

**RATNAYANI
1106106123**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BOKIMIA
JAKARTA**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Ratnayani
NPM : 1106106123
Tanda Tangan :



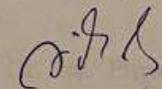
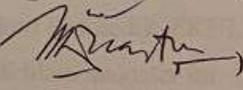
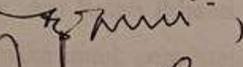
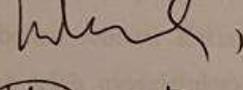
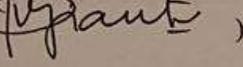
Tanggal : 11 Desember 2013

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Ratnayani
NPM : 1106106123
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Analisis Ekspresi Sitogloblin dan Kaitannya dengan Stres Oksidatif Pada Darah dan Jaringan Otak Penderita Strok Hemoragik

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof.Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS ()
Pembimbing II : dr. Ninik Mudjihartini, MS ()
Penguji I : Dr. dr. Ani Retno Prijanti, MS ()
Penguji II : dr. Nurhadi Ibrahim, PhD ()
Penguji III : Drs. Dwi Ari Pujianto, MS.PhD ()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 11 Desember 2013

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI
Dr.rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik pada Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit untuk menyelesaikan penulisan tesis ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS, sebagai dosen pembimbing I sekaligus sebagai Ketua Kekhususan Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, dan dr. Ninik Mudjihartini, MS, sebagai dosen pembimbing II. Terimakasih dan penghargaan yang sedalam-dalamnya atas curahan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing penulis selama penelitian hingga selesainya penyusunan tesis ini. Penulis juga berterima kasih kepada dr. M. Saekhu, SpBS, yang telah membantu dalam proses pengambilan sampel penelitian penderita strok hemoragik yang menjalani operasi kraniotomi.
2. Penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih kepada Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku ketua Program Magister Ilmu Biomedik, FKUI. Terimakasih atas segala bantuannya selama menempuh pendidikan magister ini.
3. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Dr. dr. Ani Retno Prijanti, MS sebagai penguji I yang telah memberikan banyak masukan untuk penulisan tesis ini, serta ucapan terimakasih disampaikan kepada beliau sebagai Ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI yang telah mengizinkan penulis memakai fasilitas departemen selama penelitian.
4. dr. Nurhadi Ibrahim, PhD sebagai penguji II dan Drs. Dwi Ari Pujianto, PhD sebagai penguji III atas segala masukannya untuk kesempurnaan penulisan tesis ini.
5. Seluruh dosen di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler yang telah memberikan banyak ilmu dan pengalaman selama menempuh pendidikan di kekhususan Biokimia dan Biologi Molekuler.
6. Seluruh staf dan laboran di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian.

7. Bapak Ir. Hardi Julendra, M.Sc sebagai Kepala UPT. Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK) Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Yogyakarta yang telah memberikan izin belajar kepada penulis serta teman-teman di UPT BPPTK LIPI, Yogyakarta.
8. Ibu Ir. Sri Hartinah, M.Si sebagai kepala Pusat Dokumentasi dan Informasi Ilmiah (PDII) LIPI yang telah memebrikan izin kepada penulis untuk berkantor di PDII selama penulis menempuh pendidikan.
9. Bapak Sugiharto, M.Si sebagai atasan langsung selama penulis berada di PDII. Terimakasih atas segala bantuan dan kemudahan yang diberikan kepada penulis selama menyelesaikan studi. Terimakasih juga penulis sampaikan kepada seluruh staf PDII LIPI.
10. Teman-teman seperjuangan: Ulfah, Aan, Anggie, Bang Hendrik, Mbak Andri, Mas Virhan, Mbak Lasma, Mbak Uli, Ika, dan Raafqi, atas semangat kekeluargaan dan keceriannya selama masa studi di kekhususan Biokimia dan Biologi Molekuler.
11. Mamah dan Bapak Cianjur serta Mama dan Bapak Jakarta atas segala doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini dengan lancar.
12. Suamiku tercinta, Muhamad Yopan, atas semangat, motivasi, dan dukungannya serta putri-putriku tersayang, Qaireen Alyaneva dan Athifa Nadyatunnisa yang selalu menyemangatiku untuk menyelesaikan pendidikan ini lewat celoteh, tawa dan keceriaanmu.
13. Pihak-pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu penulis selama masa studi hingga selesainya tesis ini.

Akhir kata penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan banyak manfaat khususnya bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 11 Desember 2013

Ratnayani

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

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

Nama : Ratnayani
NPM : 1106106123
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

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

Analisis Ekspresi Sitoglobulin dan Kaitannya dengan Stres Oksidatif Pada darah dan Jaringan Otak Penderita Strok Hemoragik

Berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Tanggal: 11 Desember 2013

Yang menyatakan



(Ratnayani)

ABSTRAK

Nama : Ratnayani
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul : Analisis Ekspresi Sitoglobin dan Kaitannya dengan Stres Oksidatif Pada Darah dan Jaringan Otak Penderita Strok Hemoragik

Telah dilakukan penelitian mengenai ekspresi sitoglobin (Cygb) dan kaitannya dengan stres oksidatif dalam darah dan jaringan otak penderita strok hemoragik. Penelitian bersifat observasional laboratorik dan pengambilan sampel berdasarkan metode *consecutive sampling*. Sampel berasal dari darah dan jaringan otak penderita strok hemoragik yang menjalani operasi kraniotomi di rumah sakit Cipto Mangunkusumo dan rumah sakit di sekitarnya. Terhadap darah dan jaringan otak ini dilakukan analisis ekspresi mRNA Cygb, protein Cygb, aktivitas spesifik katalase (CAT) dan kadar MDA. Dalam penelitian ini digunakan darah subyek normal sebagai kontrol. Pengukuran ekspresi mRNA Cygb dilakukan dengan menggunakan *real time RT-PCR Mini Opticon (BioRad)*, pengukuran kadar protein Cygb dilakukan dengan metode ELISA, aktivitas CAT diukur menggunakan metode Aebi. Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan ekspresi mRNA Cygb jaringan otak 1.24 kali dibandingkan darah penderita strok hemoragik dan peningkatan ekspresi mRNA Cygb darah penderita strok hemoragik 6.15 kali terhadap darah kontrol. Selain itu juga terjadi peningkatan kadar protein Cygb plasma penderita strok hemoragik dibandingkan plasma kontrol dan peningkatan secara signifikan kadar protein Cygb jaringan otak penderita strok hemoragik dibandingkan plasmanya. Pada jaringan otak penderita strok hemoragik juga terjadi peningkatan signifikan aktivitas spesifik katalase dibandingkan plasmanya. Peningkatan Cygb dan aktivitas spesifik CAT pada jaringan otak kemungkinan disebabkan oleh karena perannya sebagai *radical scavenger* dalam mengatasi stres oksidatif yang terjadi akibat strok hemoragik.

Kata kunci: Katalase, sitoglobin, stres oksidatif, strok hemoragik

ABSTRACT

Name : Ratnayani
Study Program : Biomedical Science Magister Program
Title : Cytoglobin Expression and Its Relation to Oxidative Stress
in Blood and Brain Tissue of Hemorrhagic Stroke Patients

The study on expression of cytoglobin (Cygb) and its relation to oxidative stress in brain and blood of hemorrhagic stroke patients has been done. This is a laboratory observational study with consecutive sampling method. Blood and brain tissue from hemorrhagic stroke patients who underwent craniotomy surgery at Cipto Mangunkusumo hospitals and nearby hospitals are used as samples. The expression of Cygb mRNA and protein, specific activity of catalase and MDA level were measured in blood and brain tissue as parameters. The blood from normal subjects are used as a control. Cygb mRNA expression was analyzed using real time RT-PCR Mini Opticon (BioRad), Cygb protein are determined using ELISA method and specific activity of catalase are measured using Aebi method. The results showed that expression of Cygb mRNA in brain tissue was increased 1.24 folds compared to blood in hemorrhagic stroke patients and expression of Cygb mRNA in patient's blood was increased 6.15 folds compared to control blood. There was also an increase of plasma Cygb proteins of hemorrhagic stroke patients compared to control plasma and significantly increased level of Cygb proteins in hemorrhagic stroke patients compared to its plasma. The specific activity of catalase in brain of hemorrhagic stroke patient was also significantly increased compared to its plasma. It is suggested that increasing expression of Cygb and specific activity of catalase in brain tissue is caused by its activity as a radical scavenger to overcome oxidative stress present in hemorrhagic stroke.

Keywords: Catalase, cytoglobin, hemorrhagic stroke, oxidative stress

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Pertanyaan Penelitian	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II. Tinjauan Pustaka	7
2.1. Sitoglobin.....	7
2.1.1 Struktur Sitoglobin.....	7
2.1.2 Struktur Hem.....	8
2.1.3 Pengikatan Ligan	9
2.1.4 Filogeni Sitoglobin.....	9
2.1.5 Peran Sitoglobin.....	10
2.1.6 Sitoglobin dan Strok... ..	10
2.2. Strok Hemoragik	11
2.3. Reactive Oxygen Species, Stres Oksidatif, Antioksidan	14
2.4. Kerangka Teori.....	18
2.5. Kerangka Konsep	19

BAB III. Metode Penelitian.....	DAFTAR ISI	20
3.1. Disain Penelitian		20
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....		20
3.3. Sampel Penelitian		20
3.4. Ijin Etik		20
3.5. Alur Penelitian		21
3.6. Bahan dan Alat Penelitian.....		21
3.6.1. Bahan Penelitian.....		21
3.6.2. Alat Penelitian.....		22
3.7. Cara Kerja		22
3.7.1 Isolasi RNA Total Darah.....		22
3.7.2 Isolasi RNA Total Jaringan Otak. . .		23
3.7.3 Primer		24
3.7.4 Amplifikasi cDNA		24
3.7.5 Pembuatan homogenate jaringan otak.....		25
3.7.6 Pembuatan Plasma Darah.....		26
3.7.7 Penentuan Kadar Protein Cygb dengan Teknik Elisa.....		26
3.7.8 Pengukuran aktivitas Enzim Katalase.....		28
BAB IV. Hasil Penelitian		29
BAB V. Pembahasan		44
BAB VI. Kesimpulan dan Saran		49
6.1. Kesimpulan		49
6.2. Saran.....		49
Daftar Pustaka		50
Lampiran		56
Daftar Riwayat Hidup... ..		82
<i>Draft</i> Artikel Ilmiah		83
Tabel 4.1. Nilai Ratarata C(q) 18sRNA dan C(q) Cygb darah subyek normal, darah dan jaringan otak penderita stroke hemoragik		31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur sitoglobin	8
Gambar 2.2	Struktur molekul hem.....	8
Gambar 2.3	Diagram pohon filogenetik keluarga globin	10
Gambar 2.4	Jalur pembentukan ROS pada cedera otak akibat hipoksia iskemia	14
Gambar 3.1	Alur penelitian	21
Gambar 3.2	Preparasi standar ELISA	27
Gambar 4.1	Ekspresi relatif mRNA darah penderita strok hemoragik	31
Gambar 4.2	Ekspresi relatif mRNA Cygb jaringan otak.....	32
Gambar 4.3	Kurva standar protein sitoglobin.....	33
Gambar 4.4	Kadar protein Cygb rata-rata plasma normal, plasma dan jaringan otak penderita strok hemoragik.....	33
Gambar 4.5	Perbandingan kadar Cygb plasma dan jaringan otak penderita strok hemoragik dari penderita yang sama.....	34
Gambar 4.6	Ekspresi mRNA Cygb dan protein Cygb jaringan otak penderita Strok hemoragik.....	35
Gambar 4.7	Hubungan antara ekspresi mRNA Cygb dengan kadar protein jaringan otak penderita strok hemoragik	36
Gambar 4.8	Rata-rata aktivitas spesifik katalase plasma normal, plasma penderita, dan jaringan otak penderita strok hemoragik.....	37
Gambar 4.9	Aktivitas spesifik katalase plasma penderita dan jaringan otak penderita pada sampel yang berpasangan	38
Gambar 4.10a	Aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA plasma penderita strok hemoragik	39
Gambar 4.10b	Aktivitas spesifik katalase dan kadar MDA jaringan otak penderita strok hemoragik	39
Gambar 4.11a	Korelasi aktivitas spesifik katalase dengan kadar MDA plasma penderita strok hemoragik	40
Gambar 4.11b	Korelasi aktivitas spesifik katalase dengan kadar MDA jaringan otak penderita strok hemoragik	41
Gambar 4.12a	Protein Cygb dan kadar MDA plasma penderita strok hemoragik	41
Gambar 4.12b	Protein Cygb dan kadar MDA jaringan otak penderita strok hemoragik.....	42

Gambar 13a	Hubungan kadar protein Cygb dengan kadar MDA plasma penderita strok hemoragik	43
Gambar 13b	Hubungan kadar protein Cygb dengan kadar MDA jaringan otak penderita strok hemoragik.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik	56
Lampiran 2. Lembar Persetujuan Subyek Penelitian	58
Lampiran 3. Data Kelengkapan Sampel.....	62
Lampiran 4. Hasil Isolasi RNA Total Darah dan Jaringan Otak Penderita Strok Hemoragik.....	64
Lampiran 5. Hasil Perhitungan Rasio Ekspresi Relatif mRNA Cygb darah penderita	65
Lampiran 6. Hasil Perhitungan Rasio Ekspresi Relatif mRNA Cygb Jaringan Otak Penderita.....	66
Lampiran 7. Analisis Protein Cygb.....	67
Lampiran 8. Data Aktivitas Katalase	72
Lampiran 9. Hasil Analisis Statistik	73

DAFTAR SINGKATAN

Risikesdas	=	Riset Kesehatan Dasar
ATP	=	<i>Adenosin Triphosphate</i>
NMDA	=	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
AMPA	=	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i>
nNOS	=	<i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	=	<i>Nitric Oxide</i>
MDA	=	Malondialdehid
PUFA	=	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
Ngb	=	Neuroglobin
Cygb	=	Cytoglobin
Mb	=	mioglobin
Hb	=	hemoglobin
CBF	=	<i>Cerebral Blood Flow</i>
COX	=	<i>Cylooxygenase</i>
ROS	=	<i>Reactive Oxygen Species</i>
H ₂ O ₂	=	Hidrogen Peroksida
TBA	=	<i>thiobarbituric acid</i>
SOD	=	Superoksida Dismutase
CAT	=	Katalase
GPx	=	Glutation Peroksidase
GRx	=	Glutation Reduktase
qRT-PCR	=	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
Cq	=	<i>cycle quotation</i>
ELISA	=	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Strok adalah permasalahan kesehatan yang serius dan merupakan ancaman terbesar karena dapat menimbulkan kecacatan dalam kehidupan manusia. Di Amerika Serikat, strok menempati urutan ketiga penyebab kematian setelah penyakit jantung dan kanker. Di Indonesia sendiri, strok merupakan penyakit yang mematikan. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007, prevalensi strok ditemukan pada 8,3 per 1000 penduduk.¹

Secara terminologi, strok adalah sindroma fokal neurologi yang terjadi mendadak dengan tipe spesifik akibat penyakit pada pembuluh darah otak. Proses ini dapat berupa penyumbatan lumen pembuluh darah oleh trombosis atau emboli. Menurut patofisiologinya, strok dikategorikan menjadi strok iskemik dan strok hemoragik. Hasil analisis data di 28 rumah sakit di Indonesia tentang kategori strok, memperlihatkan bahwa strok iskemik hampir dua kali lipat lebih besar (42.9%) dari strok perdarahan (22.7%).²

Strok hemoragik disebabkan oleh perdarahan ke dalam jaringan otak atau ke dalam ruang subaraknoid. Hal tersebut mengakibatkan sel otak mengalami kekurangan oksigen. Sel saraf pusat merupakan bagian yang sangat sensitif terhadap keadaan hipoksia yang akan mengakibatkan sel-sel otak kehilangan kemampuan untuk menghasilkan energi, terutama ATP. Penurunan energi ini menyebabkan sel otak kehilangan kemampuan untuk mempertahankan gradien ionik. Penurunan energi menyebabkan pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase yang berfungsi menjaga K^+ tinggi di intrasel dan Na^+ rendah di intrasel mengalami kegagalan. Kondisi ini menyebabkan pengeluaran kembali Na^+ juga pemasukan kembali ion K^+ terganggu. Keadaan ini menyebabkan konsentrasi ion Na^+ lebih tinggi di intrasel, akibatnya terjadi depolarisasi membran. Pintu ion kalsium (Ca^{2+}) pada sel pre sinaps teraktivasi sehingga ion Ca^{2+} masuk ke dalam sel dan akan mencetuskan pengeluaran glutamat ke ruang ekstrasel. Proses-proses yang memerlukan energi seperti *re-uptake* glutamat terhambat sehingga terjadi akumulasi glutamat di ruang ekstrasel.

Glutamat akan berikatan dengan beberapa reseptornya seperti AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*) dan NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) di post sinaps. Pengaktifan reseptor AMPA menyebabkan masuknya terutama ion Na^+ ke dalam ruang intrasel yang akan menyebabkan depolarisasi membran. Depolarisasi membran menyebabkan terlepasnya ion Mg^+ pada pintu ion Ca^+ . Selain itu, pengaktifan reseptor NMDA oleh glutamat menyebabkan terbukanya pintu ion Ca^{2+} yang sudah terbebas dari Mg^+ sehingga pada akhirnya akan terjadi penumpukan Ca^{2+} di intrasel.^{3,4,5}

Kalsium akan mengaktifkan enzim-enzim proteolitik yang akan mendegradasi struktur intrasel dan ekstrasel serta enzim lainnya seperti fosfolipase A2 yang dapat menghasilkan asam lemak bebas (seperti asam arakidonat) dari gliserofosfolipid. Asam arakidonat ini selanjutnya digunakan untuk produksi prostaglandin dan leukotrien. Dalam proses ini juga terbentuk superoksida.⁶ Kalsium juga akan mengaktifasi nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*) yang akan menghasilkan *Nitric Oxide* (NO). NO mampu bereaksi dengan superoksida menghasilkan peroksinitrit yang sangat reaktif.⁷ Radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan komponen seluler seperti lipid, DNA dan protein.

Peroksidasi lipid dapat merusak membran sel dengan mengganggu fluiditas dan permeabilitas. Tingkat oksidasi lipid salah satunya dapat ditentukan dengan mengukur jumlah produk peroksidasi yang dihasilkan. Produk peroksidasi lipid salah satunya adalah malondialdehid (MDA). Asam lemak tidak jenuh ganda (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi Malondialdehid (MDA). Jumlah MDA yang terbentuk dapat menggambarkan proses peroksidasi lipid dan biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif.⁸

Tubuh mempunyai mekanisme untuk melawan serangan radikal bebas, salah satunya dengan menggunakan antioksidan. Enzim katalase merupakan salah satu antioksidan yang berperan penting dalam menghambat oksidasi dalam jaringan tubuh. Enzim katalase bertindak sebagai katalisator dalam menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen (O_2) dan air (H_2O). Hal ini

menghindari resiko kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh hidrogen peroksida.⁹

Pada kondisi hipoksia, manusia akan berusaha bertahan hidup. Secara seluler, terdapat protein globin yang berperan dalam keadaan hipoksia yaitu neuroglobin (Ngb) dan sitoglobin (Cygb). Neuroglobin, merupakan protein ketiga yang ditemukan setelah hemoglobin dan mioglobin, Ngb banyak ditemukan pada susunan saraf pusat, korteks, *hippocampus*, *thalamus*, *hypothalamus*, dan *cerebellum* dari otak tikus.^{10,11,12,13,14} Bukti-bukti menunjukkan bahwa Ngb memiliki peran dalam perlindungan saraf pada keadaan hipoksia dan iskemik.^{15,16,17,18} Selanjutnya, ekspresi berlebihan Ngb pada tikus transgenik yang mengalami serebral oklusi dapat mengurangi ukuran infark serebral.¹⁴ Hal ini mendukung gagasan bahwa Ngb dapat melindungi neuron terhadap hipoksia-iskemik.¹⁹

Selain neuroglobin, juga terdapat protein globin lainnya yang mempunyai peranan pada keadaan hipoksia yaitu sitoglobin (Cygb). Hal ini berhubungan dengan kemampuan Cygb dalam mengikat oksigen dan memfasilitasi difusi oksigen ke dalam mitokondria.^{20,21} Cygb juga berfungsi sebagai sensor oksigen yang berpartisipasi dalam jalur transduksi sinyal yang memodulasi aktivitas regulasi protein dalam merespon perubahan konsentrasi oksigen.²⁰

Cygb merupakan salah satu protein globin yang belum lama ditemukan. Berbeda dari globin sebelumnya yaitu hemoglobin (Hb) dan mioglobin (Mb) yang memiliki struktur pentakoordinat, Cygb adalah globin dengan struktur heksakoordinat. Cygb dapat ditemukan ekspresinya pada binatang, sianobakteria dan tanaman.²² Sitoglobin pertama kali diidentifikasi dari sel stelata hati tikus yang mengalami fibrosis yang diinduksi dengan tioasetamida.²³ Sitoglobin diekspresikan diberbagai jaringan.²⁰ Pada mamalia, Cygb diekspresikan pada fibroblas dan *fibroblast like cell* dalam berbagai organ seperti hati, jantung, usus, ginjal, paru-paru, dan pankreas.²¹

Penelitian yang dilakukan oleh Hundahl *et al.* menunjukkan bahwa Ngb dan Cygb ada yang terletak dibagian otak yang sama maupun berbeda. Cygb dan Ngb ditemukan pada *cortex*, *amygdala*, *hypothalamus (medial preoptic area, supra chiasmatic nucleus, lateral hypothalamus (LH), ventromedial hypothalamic*

nucleus, dan *the arcuate nucleus*, *habenular nuclei*, *laterodorsal tegmental nucleus (LDTg)*, *pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg)*, *locus coeruleus*, *nucleus of the solitary tract* dan *spinal trigeminal nucleus*. Cygb juga ditemukan pada *hippocampus*, *reticular thalamic nucleus*, dan *dorsal raphe nucleus*.²⁴

Seperti halnya Ngb, Cygb juga mengalami peningkatan pada keadaan hipoksia. Beberapa studi menunjukkan bahwa ekspresi Cygb vertebrata pada level mRNA dan protein mengalami peningkatan sebagai respon terhadap hipoksia baik secara *in vivo*²⁵ dan *in vitro*.^{26,27} Hasil yang serupa juga disampaikan oleh Fordel *et al.* dan Li *et al.* bahwa terjadi peningkatan ekspresi mRNA Cygb pada otak tikus yang mengalami hipoksia.^{28, 29}

Pada keadaan hipoksia, terdapat beberapa penelitian yang menganalisis peranan Cygb dalam proteksi sel. Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* menunjukkan bahwa Cygb berperan dalam proteksi kultur sel neuroblastoma yang diinduksi stres oksidatif dengan hidrogen peroksida (H₂O₂).³⁰ Studi serupa dilakukan oleh Tian *et al.* yang menunjukkan bahwa Cygb berperan sebagai neuroprotektor pada tikus neonatal yang mengalami kerusakan jaringan otak akibat hipoksia-iskemia.³¹

Penelitian-penelitian mengenai peran Cygb pada keadaan hipoksia masih terus dilakukan. Namun, beberapa studi mengenai peran Cygb terutama pada jaringan otak masih terbatas pada hewan coba tikus. Bagaimana ekspresi Cygb pada stroke hemoragik belum ada publikasinya. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai ekspresi mRNA dan protein Cygb pada sel otak dan darah pasien stroke hemoragik yang menjalani operasi kraniotomi. Penelitian ini juga membandingkan ekspresi mRNA dan protein Cygb pada penderita stroke hemoragik dengan kontrol yaitu orang normal non penderita. Selain itu untuk mengukur tingkat stres oksidatif yang diakibatkan oleh stroke, dilakukan pengukuran marker stres oksidatif yaitu MDA dan aktivitas spesifik katalase. Oleh karena keterbatasan jumlah sampel maka data MDA diperoleh secara sekunder. Pemeriksaan kadar MDA dengan menggunakan sampel yang sama dengan penelitian ini, telah dilakukan oleh Nurhayati yang melakukan penelitian mengenai ekspresi neuroglobin pada penderita stroke hemoragik.

1.2 Pertanyaan penelitian

1. Bagaimana ekspresi Cygb pada darah dan jaringan otak penderita stroke hemoragik baik pada tingkat transkripsi gen maupun tingkat protein?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi Cygb dan marker stres oksidatif (MDA dan katalase) pada penderita stroke hemoragik dan normal?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum Penelitian

Menganalisis ekspresi Cygb pada darah dan jaringan otak penderita stroke hemoragik

1.3.2 Tujuan khusus penelitian

1. Mengukur rasio ekspresi relatif mRNA Cygb pada darah dan jaringan otak penderita stroke hemoragik
2. Mengukur kadar protein Cygb plasma subyek normal, plasma dan jaringan otak penderita stroke hemoragik
3. Mengukur aktivitas spesifik katalase subyek normal, plasma dan jaringan otak penderita stroke hemoragik
4. Membandingkan protein Cygb plasma penderita stroke hemoragik dengan protein Cygb plasma subyek normal dan membandingkan protein Cygb jaringan otak penderita stroke hemoragik dengan plasmanya
5. Membandingkan aktivitas spesifik katalase Cygb plasma penderita stroke hemoragik dengan aktivitas spesifik katalase plasma subyek normal dan membandingkan aktivitas spesifik katalase jaringan otak penderita stroke hemoragik dengan plasmanya

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat bagi peneliti

Dapat menambah pengalaman dan pengetahuan dalam bidang biologi molekuler yang terkait dengan stroke hemoragik.

1.4.2 Manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan

Dapat menambah informasi mengenai ekspresi Cygb dan stres oksidatifnya serta kemungkinan perannya pada stroke hemoragik.

1.4.3 Manfaat bagi masyarakat umum

Hasil penelitian ini terutama mengenai ekspresi Cygb, diharapkan dapat dimanfaatkan dalam menegakkan diagnosis (biomarker) dan prognosis pada pasien stroke hemoragik, dan kedepannya dapat digunakan sebagai terapi pada keadaan hipoksia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

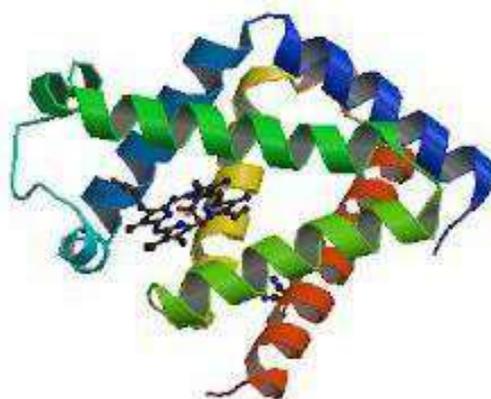
2.1 Sitoglobin

Sitoglobin (Cygb) merupakan salah satu kelompok globin yang belum lama ditemukan. Sitoglobin termasuk ke dalam globin heksakoordinat yang diekspresikan pada hewan, sianobakteria dan tanaman.²²

Sitoglobin pertama kali diidentifikasi dari sel stelata hati tikus yang mengalami fibrosis yang diinduksi dengan tioasetamida.²³ Pada mamalia, Cygb diekspresikan pada fibroblas dan *fibroblast like cell* dalam berbagai organ seperti hati, jantung, usus, ginjal, paru-paru, dan pankreas.²¹ Di dalam jaringan otak juga ditemukan adanya Cygb. Penelitian yang dilakukan oleh Hundahl *et al.* memperlihatkan bahwa Cygb ditemukan pada *cortex, amygdala, hypothalamus (medial preoptic area, supra chiasmatic nucleus, lateral hypothalamus (LH), ventromedial hypothalamic nucleus, dan the arcuate nucleus, habenular nuclei, laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg), locus coeruleus, nucleus of the solitary tract dan spinal trigeminal nucleus*. Cygb juga ditemukan pada *hippocampus, reticular thalamic nucleus, dan dorsal raphe nucleus*.²⁴

2.1.1 Struktur Sitoglobin

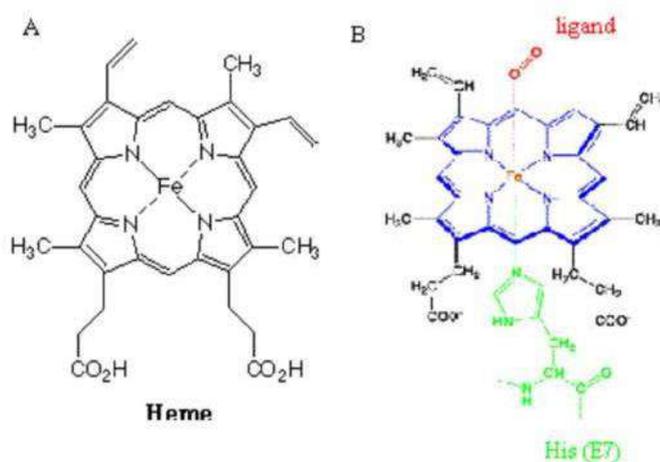
Dilihat dari struktur kristalnya, Cygb merupakan homodimer yang dimediasi oleh dua subunit jembatan disulfida, sisi Cys38 dari satu monomer berikatan kovalen dengan sisi Cys83 dari monomer lainnya, dan sebaliknya. Cygb mamalia memiliki susunan asam amino terpanjang dibanding globin lainnya, terdiri dari 190 asam amino, sedangkan globin lainnya hanya sekitar 140-150 asam amino. Susunan asam amino pada Cygb bersifat lestari (*conserved*), Asam amino Cygb manusia dan tikus hanya berbeda 4%. Residu yang penting untuk struktur dan fungsi respirasi globin adalah PheCD1, HisE7 and HisF8.²⁰



Gambar 2.1. Struktur sitogloblin¹⁰

2.1.2 Struktur hem

Cygb dan Ngb merupakan protein globin heksakoordinat, sedangkan Mb dan Hb adalah pentakoordinat. Hem terdiri dari cincin porfirin dengan 4 atom N di tengah mengikat Fe membentuk bidang datar. Fe memiliki 6 ikatan koordinasi, dimana 4 berikatan dengan nitrogen pada cincin porfirin, dan yang kelima berikatan dengan residu histidin (His113 pada sitogloblin) yang berada di sekitar hem. Koordinat yang tersisa tidak berikatan, sehingga dapat berikatan dengan ligan. Koordinat ke-6 pada hem heksakoordinat berikatan dengan residu His yang lain (His 81 pada Cygb).²⁰



Gambar 2.2. (A) Struktur molekul hem pentakoordinat
(B) Struktur molekul hem heksakoordinat

Peran dari globin heksakordinat masih belum jelas, namun biasanya dihubungkan dengan peran seluler seperti dalam menghilangkan NO dan ROS, sinyal oksigen, katalisis enzimatik, serta transport dan penyimpanan oksigen. Beberapa penelitian menunjukkan adanya aktivitas peroksidase pada Cygb.²³

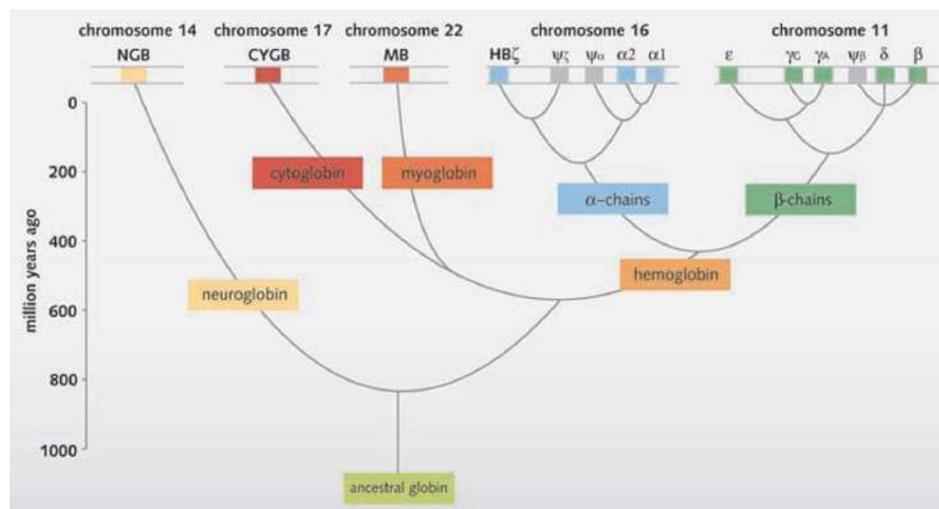
2.1.3 Pengikatan ligan

Pengikatan ligan pada globin heksakoordinat lebih kompleks dibandingkan dengan pentakoordinat. Ligan eksogen (misalnya, O₂, CO atau NO) menggantikan protein ligan endogen dari globin heksakoordinat. Ketika ligan eksogen mengikat besi hem dari Cygb, baik His81 (E7) atau His113 (F8) akan digantikan posisinya oleh ligan eksogen.³²

Hem heksakoordinat umumnya memiliki afinitas ligan lebih rendah dari hem pentakoordinat, karena disosiasi koordinat ke-6 harus terjadi sebelum pengikatan ligan.³³ Secara kinetik hem heksakoordinat dapat mengikat oksigen dan ligan lain secara *reversible*. Meskipun hem koordinasi antara Cygb dan Mb berbeda, namun *heme pocket* Cygb lebih menyerupai Mb dibanding globin lainnya. Cygb telah terbukti memiliki afinitas untuk oksigen sebanding dengan Mb.³⁴

2.1.4 Filogeni sitoglobin

Berdasarkan analisis filogenetik, Cygb dan Mb berasal dari satu gen yang sama. Akan tetapi sekitar 450 tahun yang lalu, keduanya berpisah membentuk pohon filogenetik. Hal ini didukung oleh pengamatan bahwa daerah *region* kromosom manusia yang meliputi gen Cygb (17q25) dan Mb (22q12), menggambarkan DNA genom yang panjang, yang berasal dari duplikasi *ancestor* globin yang sama. Hubungan genetik yang dekat antara Cygb dan Mb mengindikasikan bahwa peran Cygb paling erat kaitannya dengan Mb.³⁵



Gambar 2.3. Diagram pohon filogenetik keluarga globin¹⁹

2.1.5 Peran sitogloblin

Fungsi dari Cygb masih belum banyak diketahui. Beberapa kemungkinan fungsi Cygb diantaranya yaitu bahwa Cygb, seperti halnya Mb, berfungsi untuk memfasilitasi oksigen ke mitokondria. Selain itu, Cygb juga berfungsi sebagai sensor oksigen yang berpartisipasi dalam jalur transduksi sinyal yang memodulasi aktivitas regulasi protein dalam merespon perubahan konsentrasi oksigen.²⁰

Kemungkinan lain dari peran Cygb adalah dalam aktivitas enzimatik. Cygb berperan dalam menyediakan suplai O_2 pada reaksi enzimatik, misalnya pada sintesis NO yang membutuhkan O_2 untuk produksi NO dari L-Arginin, dan di sisi lain Cygb juga terlibat dalam transduksi sinyal pada sel saraf terhadap pembentukan ROS.²⁵

Peranan lain Cygb yaitu sebagai *radical scavenger*. Xu *et al.* melaporkan bahwa ekspresi berlebih Cygb dapat melindungi *hepatic stellate cells* (HSCs) dari stres oksidatif.²² Penelitian serupa dilakukan oleh Stagner *et al.* yang memperlihatkan bahwa induksi Cygb dapat melindungi β-sel islet baik secara *in vivo* maupun *in vitro* dari kematian akibat iskemia.³⁶

2.1.6 Sitogloblin dan stroke

Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa Cygb juga ditemukan pada sel saraf. Pada keadaan hipoksia termasuk dalam hal ini yang diakibatkan oleh stroke, protein Cygb mengalami peningkatan ekspresi pada berbagai jaringan yang

mengalami hipoksia tersebut. Penelitian mengenai ekspresi Cygb pada jaringan otak masih terbatas pada hewan coba tikus. Penelitian yang dilakukan oleh Fordel *et al.* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan protein Cygb pada otak tikus yang mengalami hipoksia.²⁸ Senada dengan penelitian sebelumnya, Li *et al* juga melakukan penelitian mengenai ekspresi Cygb pada otak tikus yang mengalami hipoksia. Hasilnya menunjukkan bahwa meskipun tidak signifikan tetapi terjadi peningkatan protein Cygb pada otak tikus yang mengalami hipoksia berkelanjutan maupun hipoksia intermiten selama 1, 3, 7, dan 14 hari.²⁹ Perbedaan hasil ini mungkin disebabkan oleh perbedaan lokasi jaringan otak yang diteliti. Seperti yang disampaikan oleh Fordel *et al.* bahwa terdapat perbedaan ekspresi protein Cygb pada berbagai organ (otak, otot, hati, dan jantung) tikus yang mengalami hipoksia. Berkaitan dengan perannya sebagai *radical scavenger*, untuk kepentingan *pharmaceutical*, Cygb telah diwacanakan sebagai kandidat dalam *treatment* strok. Berkaitan dengan hal tersebut, Raida *et al.* melakukan penelitian terhadap tikus yang mengalami *permanent middle cerebral artery occlusion* (pMCAo). Namun, hasilnya memperlihatkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada ekspresi Cygb antara tikus pMCAo dengan kontrol.³⁷

2.2. Strok hemoragik

Secara terminologi, strok adalah sindroma fokal neurologi yang terjadi mendadak dengan tipe spesifik akibat penyakit pada pembuluh darah otak. Proses ini dapat berupa penyumbatan lumen pembuluh darah oleh trombosis atau emboli, pecahnya dinding pembuluh darah otak yang menyebabkan perdarahan, perubahan permeabilitas dinding pembuluh darah dan perubahan viskositas maupun kualitas darah. Strok terbagi menjadi strok iskemik dan strok hemoragik. Berdasarkan anatominya, pecahnya pembuluh darah terbagi menjadi dua yaitu perdarahan intraserebral dan perdarahan subaraknoid. Pecahnya pembuluh darah dapat disebabkan oleh kerusakan dinding arteri (arterosklerosis), atau karena kelainan konginetal misalnya malformasi arteri-vena, infeksi (sifilis), dan trauma.³⁸

Proses primer yang terjadi mungkin tidak menimbulkan gejala (*silent*) dan akan muncul secara klinis jika aliran darah ke otak (*cerebral blood flow/CBF*) turun sampai ke tingkat melampaui batas toleransi jaringan otak yang disebut ambang aktivitas fungsi otak (*threshold of brain functional activity*). Dalam keadaan normal dan sehat, rata-rata aliran darah otak (*hemispheric CBF*) adalah 50.9 cc/100 gram otak/menit. Terdapat tiga derajat ambang batas aliran darah otak yang secara langsung berhubungan dengan fungsi otak³⁸, yaitu:

- a. Ambang fungsional, adalah batas aliran darah yaitu sekitar 50-60 cc/100 g otak/menit, apabila batas ini tidak terpenuhi akan menyebabkan terhentinya fungsi neuronal, tetapi integritas sel-sel saraf masih utuh.
- b. Ambang aktivitas listrik otak (*threshold of brain electrical activity*), adalah batas aliran darah sekitar 15 cc/100g otak/menit, yang apabila tidak tercapai akan menyebabkan aktivitas listrik neuronal terhenti. Ini berarti sebagian struktur intrasel telah berada dalam proses disintegrasi.
- c. Ambang kematian sel (*threshold of neuronal death*) yaitu batas aliran darah otak (kurang dari 15 cc/100 g otak/menit) yang apabila tidak terpenuhi akan menyebabkan kerusakan total sel-sel otak.

Pengurangan aliran darah yang disebabkan sumbatan atau sebab lain akan menyebabkan iskemia di suatu daerah otak. Pada iskemia otak yang luas, tampak daerah yang tidak homogen akibat perbedaan tingkat iskemia yang terdiri dari tiga lapisan (area) yang berbeda³⁸, yaitu:

1. Lapisan inti yang sangat iskemik (*ischemic-core*). Area ini terlihat sangat pucat karena CBF-nya paling rendah. Tampak degenerasi neuron, pelebaran pembuluh darah tanpa aliran darah. Kadar asam laktat di daerah ini tinggi dengan PO₂ yang rendah. Pada *ischemic core* ini terjadi nekrosis akibat kegagalan energi (*energy failure*) yang secara dahsyat merusak dinding sel beserta isinya sehingga mengalami lisis.
2. Daerah di sekitar *ischemic core* yang disebut sebagai *ischemic penumbra*. Pada daerah ini CBF nya lebih tinggi dari *ischemic core*. Meskipun sel-sel neuron tidak sampai mati, fungsi sel terhenti dan menjadi *functional paralysis*. Daerah ini masih mungkin diselamatkan dengan resusitasi dan manajemen yang tepat. Namun apabila terjadi iskemia yang berkepanjangan, sel tidak lagi mampu

mempertahan integritasnya sehingga akan terjadi kematian sel yang secara akut timbul melalui proses apoptosis, yaitu disintegrasi elemen-elemen seluler secara bertahap dengan kerusakan dinding sel yang disebut *programmed cell death*.

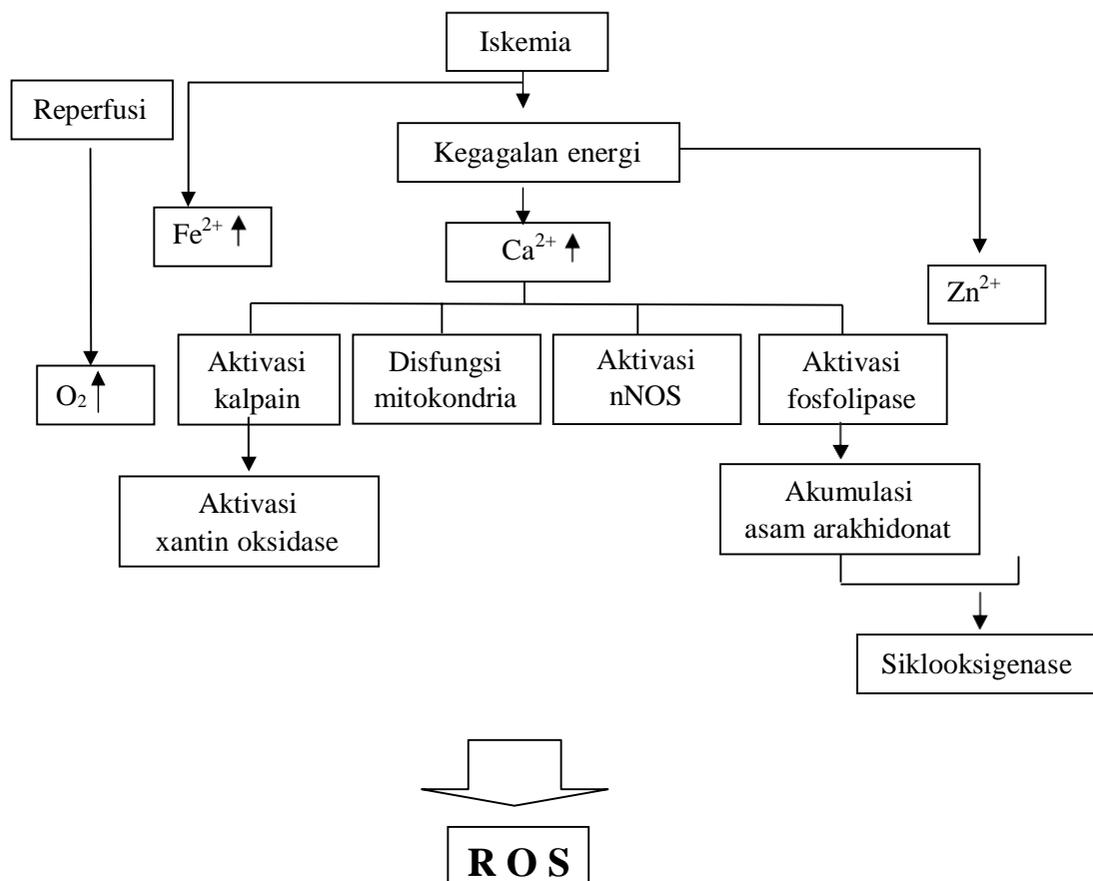
3. Daerah di sekeliling penumbra tampak berwarna kemerahan dan edema. Pembuluh darah mengalami dilatasi maksimal, PCO_2 dan PO_2 tinggi dan kolateral maksimal. Pada daerah ini CBF dangat tinggi sehingga disebut sebagai daerah dengan perfusi berlebihan (*luxury perfusion*).

Perubahan utama yang terjadi akibat strok yaitu berkurangnya kemampuan menghasilkan ATP sebagai akibat dari berkurangnya glukosa dan oksigen. Penurunan energi ini menyebabkan sel otak kehilangan kemampuan untuk mempertahankan gradien ionik. Penurunan energi menyebabkan pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase yang berfungsi menjaga K^+ tinggi di intrasel dan Na^+ rendah di intrasel mengalami kegagalan. Kondisi ini menyebabkan pengeluaran kembali Na^+ juga pemasukan kembali ion K^+ terganggu. Keadaan ini menyebabkan konsentrasi ion Na^+ lebih tinggi di intrsael, akibatnya terjadi depolarisasi membran. Pintu ion kalsium (Ca^{2+}) pada sel pre sinaps teraktivasi sehingga ion Ca^+ masuk ke dalam sel dan akan mencetuskan pengeluaran glutamat ke ruang ekstrasel. Proses-proses yang memerlukan energi seperti *re-uptake* glutamat terhambat sehingga terjadi akumulasi glutamat di ruang ekstrasel.

Glutamat akan berikatan dengan beberapa reseptornya seperti AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*) dan NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) di post sinaps. Pengaktifan reseptor AMPA menyebabkan masuknya terutama ion Na^+ ke dalam ruang intrasel yang akan menyebabkan depolarisasi membran. Depolarisasi membran menyebabkan terlepasnya ion Mg^+ pada pintu ion Ca^+ . Selain itu, pengaktifan reseptor NMDA oleh glutamat menyebabkan terbukanya pintu ion Ca^{2+} yang sudah terbebas dari Mg^+ sehingga pada akhirnya akan terjadi penumpukan Ca^{2+} di intrasel.^{3,4,5}

Selama fase iskemik dan reperfusi awal, enzim-enzim yang tergantung Ca^{2+} seperti fosfolipase A_2 dan siklooksigenase (Cyclooxygenase, COX) akan memproduksi *reactive oxygen species* (ROS). Selain itu, Ca^{2+} akan mengaktifasi *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS) yang akan menghasilkan *nitric oxide*

(NO).^{39,40} NO mampu bereaksi dengan superoksida menghasilkan peroksinitrit yang sangat reaktif.⁴ Peroksinitrit ini dapat secara langsung meningkatkan kerusakan otak, atau bereaksi dengan beberapa molekul biologi atau dikonversi menjadi OH•.⁴¹ Pada konsentrasi tinggi, NO juga dapat memperburuk kerusakan iskemik dengan menghambat rantai pernapasan mitokondria.⁴² Proses terbentuknya ROS akibat iskemia pada sel otak dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Jalur pembentukan ROS pada cedera otak akibat hipoksia iskemia⁴³

2.3 *Reactive oxygen species*, stres oksidatif dan antioksidan

Radikal bebas adalah molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan pada kulit terluar orbitnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil dan sangat reaktif terhadap molekul lainnya. Untuk mencapai kestabilan, radikal bebas mengambil elektron dari molekul/senyawa lain dan membuat molekul/senyawa tersebut menjadi radikal. Proses ini berlangsung secara *cascade*.

Reactive Oxygen Species (ROS) ada yang bersifat radikal dan non radikal. ROS yang bersifat radikal adalah radikal hidroksil (OH^\bullet), anion superoksida (O_2^\bullet), nitrit oksida (NO^\bullet), nitrogen dioksida (NO_2^\bullet), radikal peroksil (ROO^\bullet) dan radikal lipid peroksil (LOO^\bullet). Peroksinitrit (OONO^\bullet), asam hipoklorat (HOCl), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen ($^1\text{O}_2$), ozon (O_3), asam nitrat (HNO_2), dinitrogen trioksida (N_2O_3) dan lipid peroksida (LOOH) adalah molekul non radikal atau secara umum disebut oksidan, tetapi bersifat reaktif karena dapat menghasilkan radikal bebas pada makhluk hidup.⁴⁴

ROS dihasilkan baik dari sumber endogen maupun eksogen. ROS endogen dihasilkan dari aktivasi sel imun, inflamasi, stres, olahraga yang berlebihan, iskemia, infeksi, kanker dan *aging*. ROS eksogen berasal dari polusi udara dan air, rokok, alkohol, logam berat, obat-obatan tertentu dan radiasi. Setelah masuk kedalam tubuh senyawa eksogen ini akan di dekomposisi atau dimetabolisme menghasilkan radikal bebas.⁴⁴

Pada konsentrasi rendah dan sedang ROS memiliki peran esensial dalam tubuh terutama dalam sistem pertahanan tubuh. Dalam proses fagositosis neutrofil, makrofag, monosit melepaskan radikal bebas turunan oksigen, ROS yang dapat menyerang dan menghancurkan mikroba patogen sebagai bagian dari mekanisme pertahanan tubuh terhadap penyakit.^{45,46} Peran fisiologis ROS antara lain yaitu dalam sistem sinyal seluler. Contohnya adalah nitrit oksida (NO) yang berperan dalam modulasi aliran darah, trombosis dan aktivitas saraf. NO juga penting untuk sistem pertahanan tubuh dalam membunuh patogen dan tumor.⁴⁷

ROS dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu suatu kondisi dimana tingginya radikal bebas atau rendahnya mekanisme pertahanan terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Secara umum, efek berbahaya ROS yang paling sering terjadi pada sel yaitu kerusakan DNA, oksidasi asam lemak, oksidasi asam amino, dan inaktivasi enzim tertentu.⁴⁸

Peroksidasi lipid membran dapat merusak membran sel dengan mengganggu fluiditas dan permeabilitas. Peroksidasi lipid juga dapat mempengaruhi fungsi protein terikat membran seperti enzim dan reseptor.⁴⁴ Peroksidasi lipid terdiri dari beberapa proses yaitu inisiasi, propagasi, degradasi dan terminasi.⁴⁹

Peroksidasi lipid dicetuskan oleh sebuah senyawa radikal bebas, yaitu radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) yang mengekstraksi satu hidrogen dari asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid* - LH) sehingga terbentuk radikal lemak ($\text{L}\cdot$) yang setelah melalui beberapa proses maka terbentuklah malondialdehid (MDA), 9-hidroksi-nonenal, etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}) suatu radikal bebas yang merupakan metabolit reaktif peroksidasi lipid sehingga dapat digunakan sebagai indeks peroksidasi lipid.⁵⁰

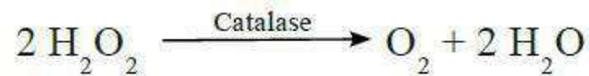
Tingkat oksidasi lipid dapat ditentukan dengan mengukur: 1) jumlah asam lemak tidak jenuh yang hilang, 2) jumlah produk peroksidasi primer, dan 3) jumlah produk peroksidasi sekunder seperti karbonil.⁵¹ MDA merupakan salah satu produk peroksidasi lipid. Asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi MDA. MDA bila direaksikan dengan asam tiobarbiturat (*thiobarbituric acid*, TBA) akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 532 nm. Jumlah MDA yang terbentuk dapat menggambarkan proses peroksidasi lipid dan biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif.⁸

Tubuh mempunyai mekanisme untuk melawan serangan radikal bebas, salah satunya dengan menggunakan antioksidan. Jika tidak diatur dengan benar, stres oksidatif dapat menyebabkan berbagai penyakit kronis dan degeneratif serta proses penuaan dan beberapa keadaan patologis akut seperti trauma, stroke dan lain-lain.⁴⁴

Antioksidan adalah zat yang menghambat oksidasi dan mampu menangkal efek merusak dari oksidasi dalam jaringan tubuh. Antioksidan dikelompokkan menjadi antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Antioksidan enzimatik yang terlibat langsung dalam netralisasi ROS yaitu superoksida dismutase (SOD),

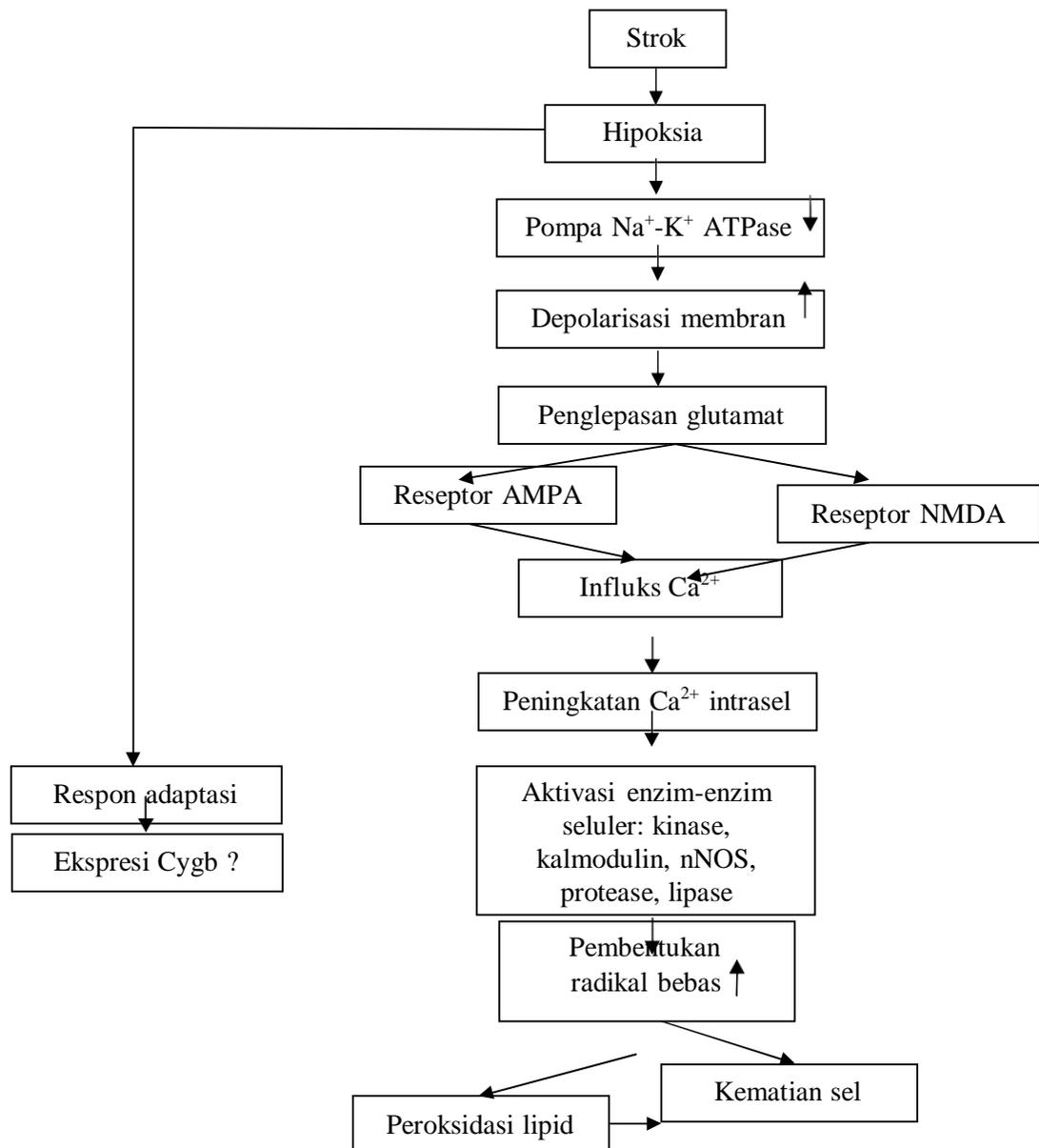
katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx) and glutathion reduktase (GRx).⁴⁴ SOD merupakan pertahanan pertama terhadap radikal bebas, mengkatalis radikal anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui reaksi reduksi. H_2O_2 diubah menjadi air dan oksigen oleh CAT dan GPx.⁵²

Enzim katalase bertindak sebagai katalisator dalam menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen dan air. Berikut persamaan reaksinya :

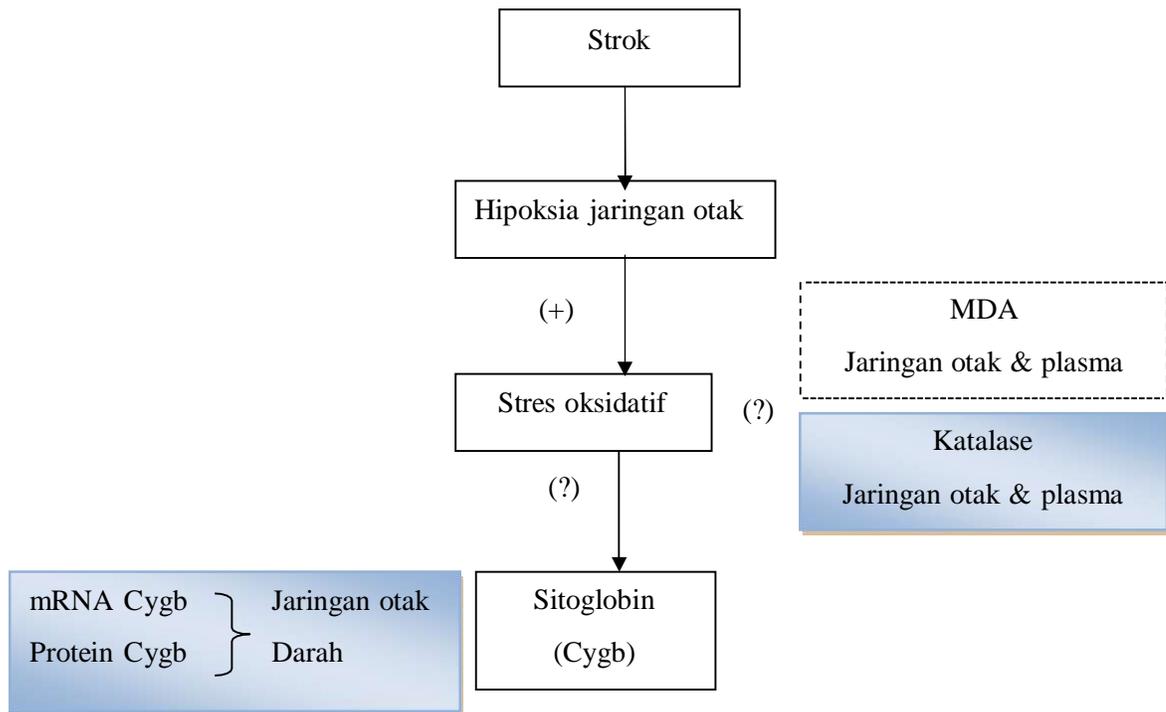


Katalase pada mamalia adalah berupa tetramer dimana setiap monomernya mengandung Fe hem (porfirin) yang terikat pada situs katalitiknya. Ekspresi berlebih katalase dalam sel kultur maupun pada hewan memberikan perlindungan dari efek buruk yang diakibatkan oleh stres oksidatif.⁷ Penelitian lain mengenai aktivitas katalase telah dilakukan oleh Alexandrova *et al.* pada penderita strok iskemia. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas katalase pada penderita strok iskemia dibandingkan kontrol.⁵³

2.4 Kerangka teori



2.5 Kerangka konsep



Keterangan:

(+) Menginduksi

 Parameter penelitian

 Data sekunder

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Penelitian ini bersifat observasional laboratorik. Sampel diambil dari penderita stroke yang menjalani operasi kraniotomi di rumah sakit Cipto Mangunkusumo dan rumah sakit di sekitarnya.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Stres Oksidatif dan Laboratorium Biologi Molekuler, Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2012 s.d. Juli 2013.

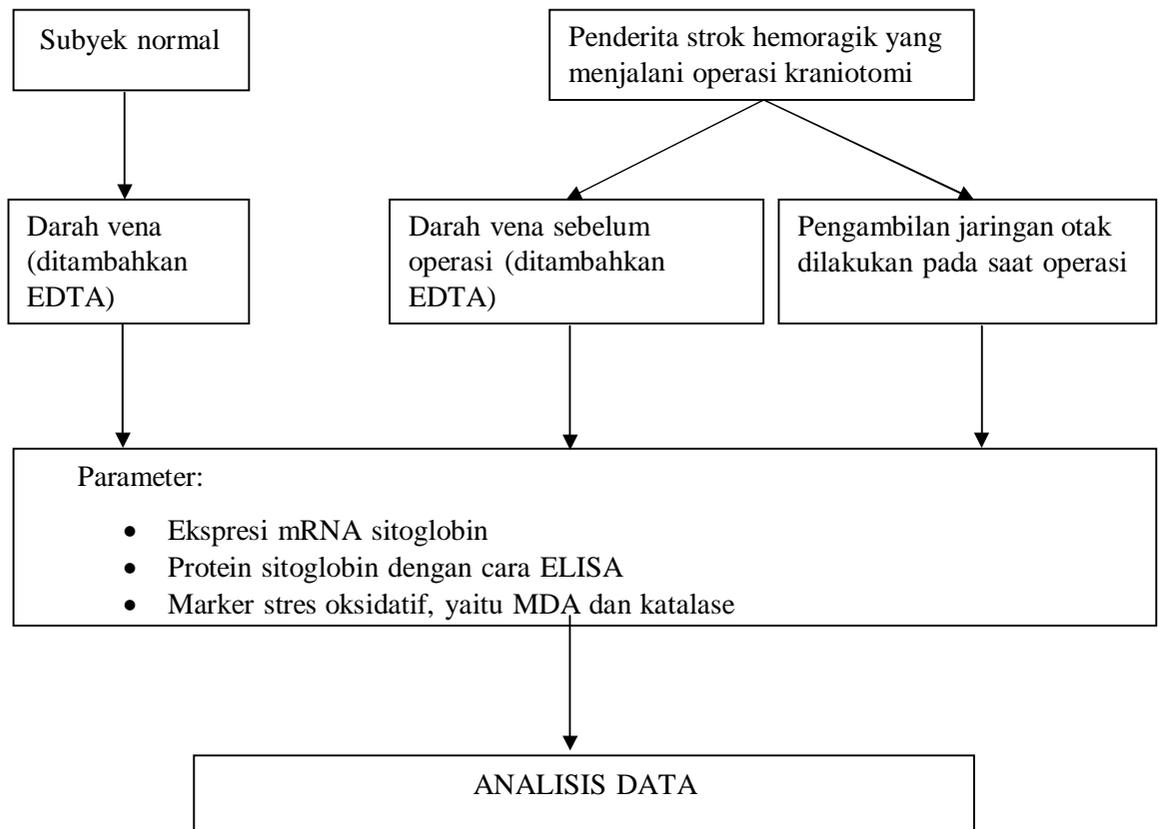
3.3 Sampel penelitian

Sampel berasal dari darah dan jaringan otak penderita stroke hemoragik yang menjalani operasi kraniotomi. Jumlah sampel ditentukan dengan metode *Consecutive Sampling* yang dilakukan sejak bulan Agustus 2012 sampai dengan bulan Maret 2013. Jarak waktu pengambilan sampel darah sampai isolasi RNA tidak lebih dari 24 jam. Darah dari 10 subyek normal digunakan sebagai kontrol.

3.4 Ijin etik

Penggunaan penderita stroke hemoragik dalam penelitian ini telah memiliki Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dengan nomor 493/PT02.FK/ETIK/2012. Sedangkan, untuk subyek normal, penelitian ini telah memiliki Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dengan nomor 110/H2.FI/ETIK/2013 dari komisi etik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

3.5 Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur penelitian

3.6. Bahan dan alat penelitian

3.6.1 Bahan penelitian

1. Reagensia untuk isolasi RNA total menggunakan *Total RNA Mini Kit* (Geneaid®, Taiwan)
2. *One-Step RT-PCR Kit with SYBR KAPA* (KAPA BIOSYSTEMS, Universal, Boston-USA) untuk *Real time RT-PCR System*
3. Primer gen *Cygb*, *forward primer 5' CTG TCG TGG AGA ACC TGC AT 3'*, *reverse primer 5' TGA CCC CAG AGA GGA TCT TGA 3'*
4. Primer gen 18 sRNA, *forward primer 5'AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG3'* dan *reverse primer 5'ACT TCT CCT CGG TGA CGT TC 3'*
5. Kit *Human Cygb* dari USCN® untuk pemeriksaan ELISA *Cygb*
6. *Bovine Serum Albumin* (Santa Cruz). Lot#A0610

7. Reagensia untuk pemeriksaan aktivitas spesifik enzim katalase: Senyawa H_2O_2 30% (BJ 1.11 kg/L) pengenceran 1:4000 dalam aquabides (molaritas 27.2 μM) dan Bufer fosfat salin pH 7.4

3.6.2 Alat penelitian

1. Timbangan digital (Sartorius)
2. *Ultra low temperature freezer* -80°C (MDF-U3286S, Sanyo)
3. *Homogenizer* (Wheaton Science, Millville, NJ-USA)
4. *Real-Time RT-PCR*, Mini Opticon, BioRad Laboratories-USA
5. Tabung *real time RT-PCR*
6. Spektrofotometer UV-Vis, BioRad Laboratories-USA
7. Sentrifus, vorteks, *water bath*
8. Tabung mikro, spuit, mikropestel,
9. Vacutainer dengan EDTA
10. Pipet mikro dan tips berbagai ukuran
11. ELISA *reader* (Biotek)

3.7. Cara kerja

3.7.1 Isolasi RNA total darah

Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan *Total RNA Mini Kit for Blood* (Geneaid®, Taiwan). Prosedur kerjanya diawali dengan menambahkan 1 mL *RBC lysis buffer* ke dalam tabung mikrosentrifugasi dan ditambahkan 300 μL *whole blood*. Diamkan dalam es selama 10 menit (tiap 5 menit di *vortex*). Setelah 10 menit, disentrifugasi pada kecepatan 5.000 g, suhu 4°C selama 5 menit. Kemudian diambil presipitatnya dan ke dalam presipitat tersebut ditambahkan kembali 100 μL *RBC lysis buffer* sambil dipipet. Selanjutnya ditambahkan 400 μL RB buffer dan 4 μL β -merkaptotanol, diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 500 μL etanol 70% ke dalam tabung tersebut, campur semua komponen yang ada dalam tabung dengan cara *pipetting*. Langkah berikutnya yaitu tempatkan *RB column* ke dalam 2 mL *collection tube*. Ke dalam *RB column* dimasukkan 500 μL campuran sampel dan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4°C , selama 1 menit. Supernatan dibuang

kemudian pada *RB column* yang sama dimasukkan sisa campuran sampel dan sentrifugasi kembali. Supernatan dibuang dan tempatkan *RB column* pada 2 mL *collection tube* yang baru. Kemudian ditambahkan 400 μ L *WI buffer* dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. Kemudian cairannya dibuang. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 600 μ L *Wash Buffer* dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. Pencucian ini dilakukan sebanyak 2 kali. Kemudian buang cairan dan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 3 menit untuk mengeringkan *column matrix*. Elusi RNA dilakukan dengan menempatkan *RB column* tersebut ke dalam 1.5 mL tabung mikrosentrifugasi dan ditambahkan 50 μ L *RNase free water* ke bagian tengah dari *matrix column* tersebut, diamkan selama 3 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. Total RNA hasil purifikasi ini dapat disimpan dalam *ultra low temperature freezer* -80⁰C.

3.7.2 Isolasi RNA total jaringan otak

Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan *Total RNA Mini Kit for Tissue* (Geneaid[®], Taiwan). Prosedurnya diawali dengan menimbang jaringan otak sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam 1.5 mL tabung mikrosentrifugasi, kemudian ditambahkan 400 μ L *RB buffer* dan 4 μ L merkaptoetanol. Jaringan dilumatkan dengan menggunakan mikropestel dan dihaluskan dengan menggunakan jarum suntik ukuran 20-G selama 5 menit. Selanjutnya homogenat tersebut dimasukkan ke dalam *filter column* yang ditempatkan dalam tabung 2 mL *collection tube* dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. *Filter column* dibuang dan pindahkan homogenat ke dalam 1.5 mL tabung mikrosentrifugasi. Pengikatan RNA dilakukan dengan menambahkan 400 μ L etanol 70% ke dalam homogenat. Tempatkan *RB column* ke dalam 2 mL *collection tube* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13000 g, suhu 4⁰C, selama 2 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 400 μ L *WI buffer* ke dalam *RB column* tersebut dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C,

selama 1 menit, dan kemudian cairannya dibuang. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 600 μL *Wash Buffer* dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. Pencucian ini dilakukan sebanyak 2 kali. Kemudian buang cairan dan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 3 menit untuk mengeringkan *column matrix*. Elusi RNA dilakukan dengan menempatkan *RB column* tersebut ke dalam 1.5 mL tabung mikrosentrifugasi dan ditambahkan 50 μL *RNase free water* ke bagian tengah dari *matrix column* tersebut, diamkan selama 3 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g, suhu 4⁰C, selama 1 menit. Total RNA hasil purifikasi ini dapat disimpan dalam *ultra low temperature freezer* -80⁰C.

3.7.3 Primer

Primer dirancang menggunakan perangkat lunak Primer 3 dan Primer Analysis. Berdasarkan hasil rancangan, diperoleh sekuen primer sitoglobin sebagai berikut: *forward primer* 5' CTG TCG TGG AGA ACC TGC AT 3', *reverse primer* 5' TGA CCC CAG AGA GGA TCT TGA 3'. Sebagai *house keeping gene* digunakan 18 sRNA dengan sekuens primer sebagai berikut: *forward primer* 5' AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG 3' dan *reverse primer* 5' ACT TCT CCT CGG TGA CGT TC 3'

3.7.4 Amplifikasi cDNA

Amplifikasi cDNA dilakukan dengan menggunakan alat *real time* RT-PCR (MiniOpticon, BioRad). Reagen yang digunakan yaitu *One-Step* RT-PCR with KAPA SYBR FAST[®]. Prinsip kerja *real time* RT-PCR hamper sama dengan PCR konvensional. Perbedaannya adalah pada *real time* RT-PCR, ampikon yang terbentuk dapat dideteksi pada saat reaksi berlangsung dengan menggunakan molekul fluoresensi yang ditambahkan pada campuran reagen.

Reagen yang digunakan untuk *real time* RT-PCR terdiri dari enzim *reverse transcriptase*, primer, *template* RNA (dipakai 100 ng) dan *nuclease free*

water. Protokol reaksi dengan *One-Step* RT-PCR Kit with KAPA SYBR FAST adalah sebagai berikut:

1. Sintesis cDNA selama 5 menit pada suhu 42°C.
2. Inaktivasi enzim *reverse transcriptase* selama 5 menit pada suhu 95°C.
3. Siklus PCR dan deteksi (40 siklus) selama 10 detik pada suhu 95°C; *annealing* 30 detik pada suhu 57.3°C (primer *Cygb*) dan 60°C (*house keeping gene* 18 sRNA); dan 30 detik pada suhu 72°C.
4. Analisis *kurva leleh* selama 1 menit pada 95°C; 1 menit pada 55°C; 10 detik pada 55°C (40 siklus, naik 0.5°C per siklus).

Real time RT-PCR digunakan untuk menentukan jumlah salinan cDNA hasil amplifikasi yang dapat menggambarkan ekspresi gen *Cygb*. Gen 18 sRNA digunakan sebagai *house keeping gene*.

Analisis ekspresi gen dinilai secara *relative quantification* menggunakan metode Livak.⁵¹ Mula-mula dilakukan normalisasi C_q (*cycle quotation*) gen sasaran terhadap gen referens untuk uji dan kalibrator. Kemudian dilakukan normalisasi ΔC_q uji terhadap ΔC_q kalibrator, sehingga rasio ekspresi dapat dihitung.

$$\Delta C_{q(\text{uji})} = C_{q(\text{sasaran, uji})} - C_{T(\text{ref, uji})}$$

$$\Delta C_{q(\text{kalibrator})} = C_{q(\text{sasaran, kalibrator})} - C_{q(\text{ref, kalibrator})}$$

$$\Delta \Delta C_q = \Delta C_{q(\text{uji})} - \Delta C_{q(\text{kalibrator})}$$

$$\text{Rasio ekspresi relative} = 2^{-\Delta \Delta C_q}$$

3.7.5 Pembuatan homogenat jaringan otak

Jaringan otak ditimbang sebanyak ± 100 mg dan ditempatkan pada tabung reaksi mikro 1.5 mL. Ditambahkan PBS 0.1 M pH 7.4 sebanyak 0.5 mL. Penambahan 0.5 mL PBS 0.1 M pH 7.4 disesuaikan dengan berat jaringan yang digunakan sehingga didapatkan konsentrasi homogenat sebesar 10%. Kemudian diforter dengan mesin *homogenizer* yang telah dipasang mikropestel dan dilumatkan hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan 0.5 mL PBS 0.1 M pH 7.4 sehingga volume menjadi 1 mL. Setelah

disentrifugasi pada kecepatan 5000 g selama 10 menit, supernatan yang dihasilkan disimpan pada suhu -20°C (bila belum digunakan).

3.7.6 Pembuatan plasma darah

Darah EDTA disentrifugasi pada kecepatan 5000 g, 4°C selama 10 menit. Plasma yang dihasilkan disimpan dalam *ultra low temperature freezer* - 80°C .

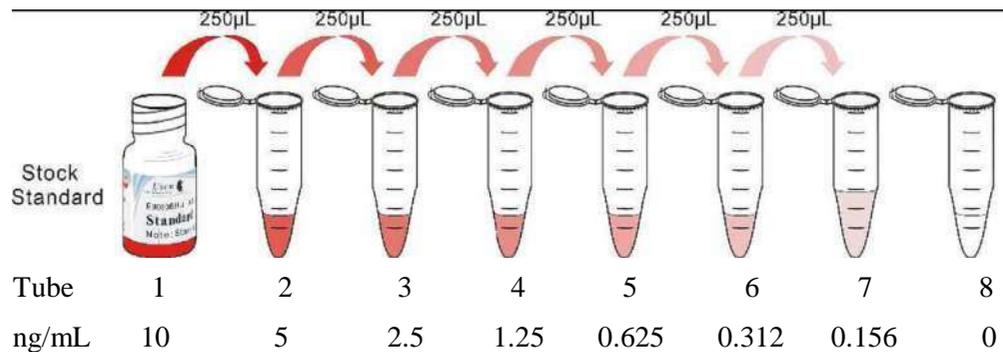
3.7.7 Penentuan kadar protein Cygb dengan teknik ELISA

Kadar protein Cygb dilakukan dengan menggunakan kit *human Cygb* (USCN[®]). Komponen dalam kit terdiri dari *microtiter plate for Cygb*, *standard Cygb*, *detection reagent A*, *detection reagent B*, *TMB substrate*, *wash buffer*, *standard diluent*, *assay diluent A*, *assay diluent B*, dan *stop solution*. Prinsip pemeriksaan kadar protein dengan metode ELISA ini adalah sumur yang digunakan pada kit telah dilapisi oleh antibodi yang spesifik terhadap Cygb. Secara ringkas prosedur pengujiannya yaitu standar dan sampel dimasukkan ke dalam sumur dengan tepat kemudian ditambahkan antibodi yang terkonjugasi dengan biotin yang spesifik terhadap Cygb. Kemudian ditambahkan avidin yang terkonjugasi dengan *horseradish peroxidase* (HRP). Selanjutnya dilakukan penambahan substrat *tetra metil benzidine* (TMB). Sumur yang mengandung Cygb akan menunjukkan perubahan warna. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan *stop solution*. Perubahan warna diukur dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm. Penentuan konsentrasi Cygb sampel ditentukan dengan membandingkan *optical density* (OD) sampel dengan kurva standar.

Secara lengkap, prosedur pemeriksaan kadar protein Cygb adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan standar. Ditambahkan 0.5 mL *standard diluent* pada *standard*. Kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Konsentrasi pada larutan standar tersebut menjadi 10 ng/mL. Siapkan 7 tabung reaksi mikro yang berisi 250 μL *standard diluent*. Sebanyak 250 μL dari stok standar

dimasukkan ke dalam tabung pertama. Kemudian 250 μL dari tabung pertama diambil kembali dan dimasukkan ke tabung kedua, demikian seterusnya sampai tabung keenam. Tabung ke tujuh hanya berisi *standard diluent* dan digunakan sebagai blanko. Konsentrasi larutan yang terbentuk mulai dari tabung pertama sampai tabung ke tujuh adalah: 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.312; 0.156 ng/mL dan 0 ng/mL.



Gambar 3.2 Preparasi standar ELISA

2. Sebanyak 100 μL larutan standar, blanko, dan sampel (plasma darah dan homogenat otak) dimasukkan ke dalam masing – masing sumur dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C.
3. Setelah diinkubasi, buang cairan dalam tiap sumur, tanpa dicuci.
4. Ditambahkan 100 μL *detection reagen A* dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
5. Buang cairan dalam sumur. Kemudian setiap sumur dicuci dengan 350 μL *wash solution* sebanyak 3 kali.
6. Pada masing – masing sumur ditambahkan 100 μL *detection reagen B*, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
7. Cairan yang ada di sumur dibuang kemudian dicuci kembali dengan 350 μL *wash solution* sebanyak 5 kali.
8. Ditambahkan 90 μL *substrate solution* (TMB) dan diinkubasi selama 15- 25 menit pada suhu 37°C.

9. Ditambahkan 50 μL *stop solution* ke dalam masing-masing sumur. Kemudian intensitas warna diukur dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm.

3.7.8 Pengukuran aktivitas enzim katalase

Penentuan aktivitas enzim katalase menggunakan metode Aebi. Prosedur pengukuran diawali dengan menentukan optimasi pengenceran sampel. Selanjutnya setiap sampel dicampur dengan larutan H_2O_2 dan absorban diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 210 nm selama 2.5 menit setiap 30 detik. Aktivitas katalase dapat dihitung dengan membandingkan serapan H_2O_2 pada menit awal setelah penambahan katalase dengan serapan pada menit berikutnya. Perbandingan dilakukan antara standar yang hanya mengandung H_2O_2 serta campuran sampel dan H_2O_2 . Rumus perhitungan katalase adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas katalase (unit}/\mu\text{L}) = \frac{\frac{\Delta s - \Delta b}{\Delta t}}{[\text{H}_2\text{O}_2] \times V_{\text{sampel}}} \times \text{faktor pengenceran}$$